(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
3 novembre 2016 (03.11.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/174349 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/18 (2006.01) *C12P 7/10* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12R 1/865* (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2016/050987

(22) Date de dépôt international :
27 avril 2016 (27.04.2016)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1553760 27 avril 2015 (27.04.2015) FR

(71) Déposant : **LESAFFRE ET COMPAGNIE** [FR/FR]; 41 Rue Etienne Marcel, 75001 Paris (FR).

(72) Inventeurs : **BAVOUZET, Jean-Michel**; 74 bis Rue J-B Lebas, 59170 Croix (FR). **DESFOUGERES, Thomas**; 20 Rue du Dr Guérin, 59960 Neuville En Ferrain (FR). **PIGNEDE, Georges**; 3 Chemin des Dames, 59700 Marcq-en-baroeul (FR). **TECHEL, Jennifer**; 28 Rue de la Melune, 7783 Le Bizet (BE).

(74) Mandataires : **BUCHET, Anne** et al.; Cabinet Laurent & Charras, Le Contemporain, 50 Chemin de la Bruyère, 69574 DARDILLY Cédex (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description (règles 13bis.4.d)i) et 48.2.a) viii))*

WO 2016/174349 A1

(54) **Title** : YEAST STRAIN HAVING IMPROVED CAPABILITY FOR FERMENTING XYLOSE IN THE PRESENCE OF ACETIC ACID

(54) **Titre** : SOUCHE DE LEVURE PRESENTANT UNE CAPACITE AMELIOREE A FERMENTER LE XYLOSE EN PRESENCE D'ACIDE ACETIQUE

(57) **Abstract** : The invention relates to a method for selecting a yeast strain having improved capability for fermenting a pentose, advantageously xylose, in the presence of organic acid, advantageously acetic acid, in non-dissociated form, in which at least one yeast strain that is capable of fermenting said pentose is consecutively cultured in the following two media: a first growth medium comprising said pentose as the only carbon source and said organic acid in non-dissociated form; a second growth medium comprising another carbon source as the only carbon source, advantageously glucose, free of said organic acid in non-dissociated form, the consecutive culture in at least said two growth media being repeated at least twice, in the presence of rising concentrations of organic acid in non-dissociated form.

(57) **Abrégé** : Procédé de sélection d'une souche de levure présentant une capacité améliorée à fermenter un pentose, avantageusement le xylose, en présence d'acide organique, avantageusement d'acide acétique, sous forme non dissociée, dans lequel au moins une souche de levure présentant une capacité à fermenter ledit pentose est cultivée successivement dans les 2 milieux suivants: -un premier milieu de croissance comprenant comme seule source de carbone ledit pentose et ledit acide organique sous forme non dissociée; -un deuxième milieu de croissance comprenant comme seule source de carbone une autre source de carbone, avantageusement duglucose, et dépourvu dudit acide organique sous forme non dissociée, la culture successive dans au moins ces deux milieux de croissance étant répétée au moins deux fois, en présence de concentrations croissantes en acide organique sous forme non dissociée.

SOUCHE DE LEVURE PRESENTANT UNE CAPACITE AMELIOREE A FERMENTER LE XYLOSE EN PRESENCE D'ACIDE ACETIQUE

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention a trait aux souches de levures aptes à fermenter les pentoses, en particulier le xylose, y compris en présence d'inhibiteurs de cette fermentation tels que l'acide acétique sous forme non dissociée.

Plus précisément, la présente invention offre un procédé permettant de sélectionner des souches améliorées, très performantes dans leur capacité à métaboliser ce type de sucres présents dans les hydrolysats lignocellulosiques.

ETAT DE LA TECHNIQUE

La biomasse lignocellulosique ou végétale, issue essentiellement de l'activité agricole et agro-industrielle, est un substrat complexe, constitué de trois principales fractions que sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Il s'agit d'un déchet potentiellement recyclable, utile pour la production d'éthanol dont la demande, en vue par exemple de son utilisation en tant que biocarburant, ne cesse de croitre.

Le procédé de production d'éthanol à partir de la biomasse lignocellulosique consiste à récupérer par hydrolyse le maximum de sucres présents dans les fractions cellulosiques et hémicellulosiques puis de les transformer en éthanol par fermentation.

Concernant la fermentation des sucres présents dans cette biomasse comprenant à la fois des sucres en C6 (hexoses) ou des sucres en C5 (pentoses), il est aujourd'hui favorisé la fermentation anaérobie par les levures, en particulier à l'aide de *Saccharomyces cerevisiae* dont la capacité à fermenter le glucose est largement maîtrisée et exploitée.

Toutefois, toute l'attention s'est portée sur la fermentation des pentoses, notamment le xylose, qui peuvent représenter jusqu'à 25 à 40% des sucres totaux contenus dans la biomasse lignocellulosique. Ainsi, des souches de levures aptes à fermenter le glucose ont été modifiées pour pouvoir également métaboliser les pentoses.

A titre d'exemple, le document WO 2010/000464 rapporte l'obtention de souches de levure aptes à fermenter les pentoses grâce à un gène bactérien codant une xylose isomérase (XI) qui convertit le xylose en xylulose métabolisable par la levure.

A noter que de manière alternative, une voie eucaryote comprenant une xylose réductase (XR ou *XYL1*) générant du xylitol et une xylitol déshydrogénase (XDH ou *XYL2*) permet également d'aboutir au xylulose.

Ainsi, le document WO 2012/072793 décrit des souches de levure améliorées, associant des gènes exogènes codant une xylose isomérase et une xylitol déshydrogénase permettant d'éliminer le xylitol qui s'avère être un inhibiteur de la xylose isomérase. De telles souches, en particulier la souche déposée à la CNCM le 5.10.2011 sous le numéro I-4538, présentent des rendements améliorés et donc une utilité industrielle avérée pour la production d'éthanol.

Une autre problématique cruciale a été la mise en évidence, dans les hydrolysats lignocellulosiques, d'inhibiteurs de la fermentation parmi lesquels figurent des furaldéhydes (furfural, HMF), des composés phénoliques et des acides organiques (acide acétique, acide lévulinique, acide formique). En particulier, la présence de forte concentration en acide acétique, supérieure à 5 g/kg (de milieu initial) et pouvant atteindre jusqu'à 10 g/kg, est intrinsèquement liée à celle de groupements acétyles associés de manière covalente avec les molécules d'hémicellulose.

Des travaux antérieurs ont abordé l'amélioration de la résistance des souches vis-à-vis de la présence d'acide acétique dans les mouts de fermentation. Ainsi, le document WO 2011/080411 a rapporté l'obtention de souches de levure dont la résistance à l'acide acétique sur glucose a été améliorée.

Cependant, l'acide acétique est également un inhibiteur de la fermentation du xylose. Cette inhibition se caractérise par une réduction de la cinétique de consommation du xylose (Bellisimi *et al.*, FEMS Yeast Res., 2009. 9 :358-364), alors que sur le glucose, cette inhibition se traduit par un retard lors de l'initiation de la fermentation, la cinétique restant par la suite inchangée. A noter qu'en présence à la fois de glucose et de xylose dans le milieu, les souches de levure fermentent en priorité le glucose en raison de la répression catabolique.

Ainsi, les documents WO 2013/178915 et WO 2013/178918 décrivent des procédés d'obtention de souches de levure aptes à métaboliser les pentoses, notamment le xylose, et résistantes aux inhibiteurs de fermentation, en particulier l'acide acétique.

Il existe toutefois un besoin évident d'obtenir de nouvelles souches de levure capables de fermenter les hexoses et les pentoses, avec un impact encore réduit des inhibiteurs de la fermentation, en particulier de l'acide acétique, notamment sur la cinétique de fermentation des pentoses tels que le xylose.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente invention repose sur la mise en évidence par les inventeurs de la possibilité d'isoler de nouvelles souches de levure présentant une résistance vis-à-vis des inhibiteurs de la fermentation, en particulier de l'acide acétique, non seulement au niveau de leur métabolisme du glucose mais également au niveau de la fermentation des pentoses, en particulier du xylose.

Ainsi et dans le cadre de l'invention, il a été mis au point un procédé de sélection de souches de levure présentant une fermentation améliorée des pentoses, en particulier du xylose, en présence d'inhibiteurs de la fermentation de type acide organique, en particulier l'acide acétique. A l'aide d'un tel procédé, il a été possible d'isoler des souches présentant une cinétique de fermentation du xylose améliorée, en termes de vitesse de consommation du xylose, y compris en présence de fortes teneurs en acide acétique.

A noter que des travaux antérieurs se sont déjà intéressés à cette problématique :

Ainsi, le document (Wright *et al.*, FEMS Yeast Res., 2011. 11: 299-306) rapporte l'amélioration de la résistance de souches vis-à-vis de l'acétate sur xylose. Ces travaux tendent à montrer que le phénomène de résistance vis-à-vis de l'acide acétique sur xylose pourrait être un processus inductible. De surcroît, les résultats présentés apparaissent comme extrêmement mitigés :

Les cultures sélectionnées par la méthode SBR (« *Single Batch Repeat* ») ou avec un chemostat limité en xylose démontrent seulement une faible diminution de la concentration finale en xylose et par voie de conséquence une faible augmentation de la concentration en éthanol au cours des 3 premiers jours, par rapport aux résultats de la souche de départ.

Par ailleurs, le pic du taux de consommation spécifique du xylose en fonction de la concentration d'acide acétique culmine pour une valeur très proche de celle observée pour la souche de départ, soit 2,5 g/L.

De plus, il est observé qu'avec la souche isolée, la vitesse de consommation spécifique du xylose décroit ensuite de façon comparable à ce qui est observé avec la souche de départ. D'après les conclusions tirées, ces résultats indiqueraient qu'une sélection prolongée en culture SBR ne peut pas conduire à un phénotype stable de tolérance à l'acide acétique.

Un autre document (Sanda *et al.*, Bioresource Technology, 2011. 102 :7917-7924) a rapporté la mise en œuvre d'une évolution dirigée sur un hydrolysat lignocellulosique contenant du glucose et du xylose. Toutefois, la technique SBR qui permet de sélectionner les souches se multipliant le plus vite a abouti à la sélection des souches poussant le plus rapidement sur glucose.

En dépit des échecs de l'art antérieur, les inventeurs ont mis au point un nouveau procédé de sélection permettant d'aboutir à des souches de levure présentant les caractéristiques espérées en termes de fermentation du xylose en présence d'acide acétique.

Selon un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de sélection d'une souche de levure présentant une capacité améliorée à fermenter un pentose en présence d'acide organique sous forme non dissociée.

Ainsi, le procédé selon l'invention permet, à partir d'une souche isolée ou d'un mélange de souches, de sélectionner une souche présentant un avantage sélectif en termes de croissance sur un milieu contenant ledit pentose et ledit acide organique sous forme non dissociée.

Le procédé, objet de la présente demande, peut être mis en œuvre sur une souche isolée, en particulier sur les souches suivantes :

- la souche déposée à la CNCM en date du 16.05.2013 sous le numéro I-4749 ;
- la souche déposée à la CNCM en date du 12.12.2013 sous le numéro I-4829 ;
- la souche déposée à la CNCM en date du 9.04.2015 sous le numéro I-4966.

Dans ce cas de figure et sans vouloir être liés à une quelconque théorie, la pression de sélection exercée par les cultures successives dans les milieux de croissance définis ci-après permet à la souche d'acquérir les traits phénotypiques nécessaires à l'augmentation de sa capacité à fermenter un pentose en présence d'acide organique sous forme non dissociée.

Selon un autre aspect, c'est un mélange de souches de levure qui est soumis au procédé selon l'invention. Dans ce cas de figure, au moins l'une des souches subit la pression de sélection comme décrit ci-dessus, de manière à développer une capacité améliorée à fermenter un pentose en présence d'acide organique sous forme non dissociée. Alternativement, le mélange de souches contient déjà une souche présentant une capacité améliorée à fermenter un pentose en présence d'acide organique sous forme non dissociée et le procédé selon l'invention permet d'enrichir le mélange en cette souche, en raison de sa multiplication plus rapide, et ainsi d'isoler ou de sélectionner ladite souche.

Selon un mode de réalisation particulier, avant leur culture dans les différents milieux de croissance selon l'invention, la souche de levure ou le mélange de souches est soumis à une étape préalable de mutagénèse susceptible de favoriser l'apparition du phénotype recherché. De manière classique, cette mutagénèse peut être réalisée par exposition à un agent chimique ou à un rayonnement, notamment aux ultraviolets (UV). Il est avantageusement choisi des conditions « douces », par exemple une exposition de 100 à 500 J/cm^2, par exemple 300 J/cm2, de rayonnement UV à 254 nm.

Selon le procédé de l'invention, la souche de levure ou le mélange de souches est cultivé successivement dans au moins deux milieux de croissance. Dans le cadre de la présente demande, les expressions « milieu de croissance » ou « milieu de culture » sont utilisées indifféremment pour désigner un milieu comprenant les ingrédients nécessaires à la survie voire à la multiplication des levures en présence.

Le premier milieu de croissance se caractérise en ce qu'il comprend, comme seule source de carbone, le pentose dont la capacité de fermentation améliorée est recherchée. Il s'agit avantageusement du xylose ou de l'arabinose, encore plus avantageusement du xylose. De manière avantageuse, ce premier milieu est un milieu liquide.

De manière avantageuse, la concentration en pentose du milieu de croissance est celle couramment mise en œuvre lorsque celui-ci est utilisé comme seule source de carbone, à savoir comprise entre 5 et 100 g/L dans le cas d'un milieu liquide (5 et 100 g/kg dans le cas d'un milieu solide), avantageusement comprise entre 25 et 90 g/L, par exemple égale à 50 g/L. Selon un mode de réalisation particulier, le milieu de croissance contient 50 g/L de xylose.

Ledit milieu comprend également l'acide organique susceptible d'inhiber la fermentation dudit pentose. Il s'agit avantageusement d'acide acétique ou d'acide formique, encore plus avantageusement d'acide acétique.

A noter que de manière connue, seule la forme non dissociée ou non ionisée de tels acides présente une capacité d'inhibition. Dans le cadre de l'invention, on entend par « forme non ionisée ou non dissociée » d'un acide carboxylique sa forme protonée. En pratique, la forme de tels acides organiques dépend du pH du milieu dans lequel ils sont incorporés. A un pH supérieur au pKa de l'acide, celui-ci se trouve majoritairement sous forme dissociée ou d'ions COO^-. Au contraire et à un pH inférieur, la forme majoritaire est la forme non dissociée ou non ionisée (COOH). Dans la suite de l'invention, il sera précisé, notamment en rapport avec les quantités ou concentrations, si seule la forme non dissociée de l'acide organique en présence est prise en compte, ou s'il est fait référence à l'acide acétique introduit dans le milieu, englobant formes dissociée et non dissociée en fonction du pH dudit milieu.

De manière avantageuse, la concentration en acide organique sous forme non dissociée, avantageusement en acide acétique, du milieu de croissance est comprise entre 0,5 et 5 g/L en milieu liquide (équivalent à 0,5 et 5g/kg en milieu solide), avantageusement entre 1,3 et 2,6 g/L. En pratique et à titre d'exemple, cette dernière fourchette correspond à une concentration en acide acétique ajoutée à un milieu de croissance à pH 5 comprise entre 3 et 6 g/L.

Selon l'invention, ce premier milieu de croissance est mis en œuvre dans un cycle de croissance sur au moins deux, voire trois milieux, ledit cycle étant répété au moins deux fois. De manière adaptée selon l'invention, au cours des au moins 2 cycles de croissance, la concentration en acide organique sous forme non dissociée est augmentée.

En d'autres termes, la culture successive dans au moins les deux milieux de croissance définis dans la cadre de l'invention est répétée au moins deux fois, en présence de concentrations croissantes en acide organique, avantageusement de l'acide acétique, sous forme non dissociée. Ainsi et en présence de n cycles (avec n supérieur ou égal à 2), au moins deux concentrations sont mises en œuvre, la première concentration étant inférieure à la seconde concentration.

A titre d'exemple et pour 8 cycles de culture en présence d'acide acétique, un schéma d'augmentation de la concentration dans le premier milieu de croissance peut être le suivant :

- 1er cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 3 g/L (soit 1,3 g/L d'acide acétique sous forme dissociée) ;
- 2ème cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 3 g/L (soit 1,3 g/L d'acide acétique sous forme non dissociée) ;

- 3ème cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 3 g/L (soit 1,3 g/L d'acide acétique sous forme non dissociée) ;
- 4ème cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 4 g/L (soit 1,7 g/L d'acide acétique sous forme non dissociée) ;
- 5ème cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 4 g/L (soit 1,7 g/L d'acide acétique sous forme non dissociée) ;
- 6ème cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 4 g/L (soit 1,7 g/L d'acide acétique sous forme non dissociée) ;
- 7ème cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 5 g/L (soit 2,15 g/L d'acide acétique sous forme non dissociée) ;
- 8ème cycle : concentration en acide acétique ajoutée dans un milieu à pH 5 égale à 6 g/L (soit 2,6 g/L d'acide acétique sous forme non dissociée).

Outre ces deux ingrédients, ce milieu de croissance est avantageusement un milieu synthétique complet, adapté à la croissance des levures et pouvant contenir des ingrédients classiques tels que des sels, des agents tampons, de l'extrait de levure ou toute autre source d'azote métabolisable par la levure, des vitamines… . Dans le cadre de l'invention, on entend par « milieu synthétique » un milieu dont la composition chimique est connue.

Selon un mode de réalisation particulier, outre le pentose en tant que seule source de carbone et l'acide organique, un tel milieu peut donc comprendre :

- extrait de levure (EXL), avantageusement à hauteur de 5 g/L ;
- di-amonium phosphate, avantageusement à hauteur de 4,7 g/L ;
- acide citrique, avantageusement à hauteur de 11,4 g/L ;
- citrate tri-sodique, avantageusement à hauteur de 13,5 g/L ;
- $ZnSO_4$, avantageusement à hauteur de 21,2 mg/L ;
- $MgSO_4\,7H_2O$, avantageusement à hauteur de 1 g/L ;
- Thiamine, avantageusement à hauteur de 18,24 mg/L ;
- Pyridoxine, avantageusement à hauteur de 5,28 mg/L ;
- Biotine, avantageusement à hauteur de 1,76 g/L ;
- Panthoténate, avantageusement à hauteur de 3,8 mg/L ;
- acide nitotinique, avantageusement à hauteur de 20 mg/L ;
- myo-inositol, avantageusement à hauteur de 50 mg/L ;
- riboflavine, avantageusement à hauteur de 1 mg/L ;
- para-amino-benzoate, avantageusement à hauteur de 1,2 mg/L ;
- tween 80, avantageusement à hauteur de 1 g/L.

Outre la composition spécifique de ce premier milieu de croissance, la culture de la souche de levure ou du mélange de souches est avantageusement réalisée dans des conditions standard favorables à la croissance des levures, en particulier de type *Saccharomyces*, et à leur activité de fermentation, à savoir :

- un pH acide, avantageusement compris entre 4 et 6, voire 4,5 et 5,5, encore plus avantageusement égal à 5 ;
- une température comprise entre 28 et 37°C, voire entre 30 et 35°C, avantageusement égale à 32°C ;
- sous faible agitation, par exemple égale à 100 rpm ;
- dans des conditions réduites d'apport en oxygène (sous O_2 limité). En pratique, la culture peut être réalisée dans une fiole obturée à l'aide d'un bouchon réduisant l'apport d'O_2 dans le milieu tout en permettant l'évacuation du CO_2 produit.

De manière générale, la culture est stoppée lorsque la source de carbone osidique, en l'occurrence le pentose, a été totalement consommée. En pratique et de manière avantageuse, la culture est menée pendant au moins 24 heures, voire plusieurs jours, avantageusement 7 jours.

La deuxième étape du procédé selon l'invention consiste à transférer les levures cultivées dans le premier milieu de croissance dans un deuxième milieu de croissance, avantageusement liquide. De manière caractéristique, celui-ci se distingue du premier milieu de culture par la présence d'une source de carbone différente et par l'absence de l'acide organique, avantageusement de l'acide acétique, sous forme non dissociée.

En pratique, ce milieu est favorable à la croissance des levures et permet de lever les phénomènes d'adaptation, au profit de l'acquisition de mutations stables. Ainsi, cette étape du procédé selon l'invention est considérée comme une phase de désadaptation.

Ce second milieu de croissance se caractérise en ce qu'il comprend, comme seule source de carbone, une source de carbone différente de celle du premier milieu de culture, à savoir un pentose, en particulier du xylose. Selon un mode de réalisation particulier la source de carbone du second milieu de culture est une source de carbone osidique, avantageusement un hexose, encore plus avantageusement du glucose. De manière avantageuse, la concentration en cette seconde source de carbone, avantageusement en glucose, est comprise entre 5 et 50 g/L, avantageusement comprise entre 5 et 20 g/L, par exemple égale à 20 g/L.

Par ailleurs et de manière avantageuse, il s'agit d'un milieu de croissance synthétique riche, comprenant par exemple :

- de l'extrait de levure, avantageusement à hauteur de 10 g/L ;
- de la peptone, avantageusement à hauteur de 10 g/L .

De manière avantageuse, il s'agit donc d'un milieu riche permettant à toutes les souches de levures de se multiplier sans aucune limitation qui serait liée à une quelconque auxotrophie.

Outre la composition spécifique de ce second milieu de croissance, la culture de la souche de levure ou du mélange de souches est avantageusement réalisée dans des conditions standard favorables à la croissance des levures, à savoir :

- un pH acide et stable, avantageusement compris entre 4 et 6, par exemple égal à 5 ;
- une température comprise entre 28 et 37°C, voire entre 30 et 35°C, avantageusement égale à 30°C ;
- sous agitation moyenne, par exemple égale à 150 rpm ;
- en présence d'oxygène, à savoir en aérobiose. En pratique, la culture peut être réalisée dans une fiole à baffles obturée par un bouchon poreux qui permet l'apport d'O_2 dans le milieu et l'évacuation du CO_2 produit.

Là encore, la culture est stoppée lorsque la source de carbone osidique, avantageusement le glucose, a été totalement consommée. Il est à noter qu'en pratique, la croissance dans ce second milieu est plus rapide que dans le premier milieu en raison de l'aérobiose, du glucose en tant que source de carbone et de l'absence d'acide acétique. Ainsi et de manière avantageuse, la culture est menée pendant plusieurs heures, avantageusement 24 heures.

Selon l'invention, la culture des levures successivement dans les deux milieux de croissance et dans les conditions décrites ci-dessus constitue un cycle.

Selon un mode de réalisation particulier, un cycle dans le procédé selon l'invention comprend en outre le passage des levures dans un troisième milieu de croissance, avantageusement liquide, destiné à sélectionner les cellules capables de respirer, à savoir présentant des mitochondries fonctionnelles. En pratique, cette étape, qui peut être mise en œuvre à chaque cycle ou au moins une fois dans le procédé, permet de s'affranchir de l'apparition des « petites », dont le phénotype déficient respiratoire peut être désavantageux dans le cadre des procédés de production de levures industrielles.

De manière avantageuse, ce troisième milieu est un milieu pauvre ou minimum, contenant comme seule source de carbone une source de carbone qui ne peut être utilisée que par les cellules qui ont conservé des mitochondries fonctionnelles. On parle dans ce cas de source de carbone respiratoire stricte, c'est à dire de source de carbone impliquant de manière systématique une oxydation mitochondriale et ne produisant pas d'éthanol. Il peut s'agir avantageusement du glycérol ou éventuellement de l'éthanol. En d'autres termes, un tel milieu est dépourvu de sucre fermentescible. Avantageusement, la concentration en glycérol du milieu de croissance est celle couramment mise en œuvre lorsque celui-ci est utilisé comme seule source de carbone, à savoir comprise entre 5 et 50 g/L, avantageusement comprise entre 10 et 50 g/L, par exemple égale à 10 g/L de manière à obtenir une biomasse suffisante pour inoculer le premier milieu de culture du cycle suivant.

Par définition, un milieu minimum contient, outre une source de carbone, une source d'azote, une source de potassium, une source de phosphore, une source de soufre, une source de magnésium, une source de calcium, une source de fer, une source d'oligoéléments et de l'eau.

Un milieu pouvant servir à l'élaboration de ce troisième milieu de culture peut comprendre :

- une base, telle que « yeast nitrogen base » de DIFCO®, avantageusement à hauteur de 3,4 g/L ;
- et éventuellement du sulfate d'ammonium, avantageusement à hauteur de 5 g/L.

Outre la composition spécifique de ce troisième milieu de croissance, la culture de la souche de levure ou du mélange de souches est avantageusement réalisée dans des conditions standard favorables à la croissance des levures, à savoir :

- un pH acide, avantageusement compris entre 4 et 6, voire 4,5 et 5,5, par exemple égal à 5 ;
- une température comprise entre 28 et 37°C, voire entre 30 et 35°C, avantageusement égale à 30°C ;
- sous agitation moyenne, par exemple égale à 150 rpm ;
- en aérobiose. En pratique, la culture peut être réalisée dans une fiole à baffles obturée par un bouchon poreux qui permet l'apport d'O_2 dans le milieu.

Là encore, la culture est stoppée lorsque la source de carbone, avantageusement le glycérol, a été totalement consommée. Il est à noter qu'en pratique, la croissance dans ce milieu est *a priori* moins rapide que dans le second milieu en raison de la source d'azote minérale. Ainsi et de manière avantageuse, la culture est menée pendant plusieurs heures, avantageusement 48 heures.

Comme déjà mentionné, le procédé selon l'invention se caractérise en ce que la culture de la souche de levure, successivement dans les deux ou trois milieux de croissance décrits ci-dessus, est itérée sous forme de cycles.

Le nombre de cycle est choisi de manière à favoriser la sélection de la souche présentant la caractéristique recherchée, à savoir une capacité améliorée à fermenter un pentose en présence d'un acide organique inhibiteur, tout en limitant le nombre de cycles pour éviter l'apparition de tares chez les levures.

Ainsi et de manière avantageuse, le nombre de cycles est au moins égal à deux et avantageusement inférieur ou égal à 10, par exemple égal à 8. En d'autres termes, la culture successive dans au moins les deux milieux de croissance tels que définis est répétée au moins deux fois, avantageusement plus de 2 fois mais moins de 10 fois, par exemple 8 fois.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, la culture successive dans au moins les deux milieux de croissance est répétée au moins deux fois, en présence de concentrations croissantes en acide organique, avantageusement de l'acide acétique, sous forme non dissociée. En d'autres termes, le procédé selon l'invention est réalisé en présence d'au moins deux concentrations distinctes, la première concentration étant inférieure à la seconde. L'augmentation de cette concentration peut se faire de manière graduelle, éventuellement par paliers. Ainsi et de manière avantageuse pour l'adaptation des souches de levure, au moins les deux premiers cycles sont réalisés à concentration constante.

Selon un autre aspect avantageux, la concentration du premier milieu de croissance en acide organique, avantageusement en acide acétique, sous forme non dissociée est comprise entre 1,3 et 2,6 g/L.

Lorsque le nombre de cycles souhaité est atteint et pour obtenir des clones différenciés, la culture est avantageusement étalée sur un milieu solide, encore plus avantageusement sur un milieu synthétique favorable à la croissance des levures, tel que le milieu YPG. Le niveau d'ensemencement est typiquement de 2000 cellules par plaque et la croissance a lieu à 30°C pendant environ 72 heures.

Dans un mode de réalisation particulier, les performances des clones ainsi isolés sont testées.

A cette fin, des précultures en milieu liquide, avantageusement dans un milieu synthétique favorable à la croissance des levures, tel que le milieu YPG, peuvent être réalisées.

De manière avantageuse, ces précultures servent à l'ensemencement d'un milieu de sélection, à savoir un milieu équivalent au premier milieu de croissance décrit ci-dessus, comprenant comme seule source de carbone ledit pentose, avantageusement du xylose, et ledit acide organique, avantageusement de l'acide acétique, sous forme non dissociée. De manière privilégie, une concentration moyenne en acide acétique est choisie, par exemple égale à 5 g/L pour un milieu à pH 5.

De manière avantageuse, les clones sélectionnés sont ceux présentant la meilleure croissance dans ce milieu. Le niveau de croissance peut être déterminé par l'analyse de la turbidité via une mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde comprise entre 600 et 700 nm, par exemple égale à 630 nm. En pratique, la croissance peut être évaluée dans des microplaques de type DeepWeel ou en milieu liquide dans les conditions énoncées ci-dessous, à savoir :

- un pH acide, avantageusement compris entre 4 et 6, voire 4,5 et 5,5, encore plus avantageusement égal à 5 ;
- une température comprise entre 28 et 37°C, voire entre 30 et 35°C, avantageusement égale à 32°C ;
- sous faible agitation, par exemple égale à 100 rpm, ou sans agitation ;
- dans des conditions réduites d'apport en oxygène (sous O_2 limité ou en anaérobie) ;
- un temps de croissance d'au moins 24 heures, par exemple de 72 heures.

Le taux d'ensemencement doit être modéré pour éviter un effet « titrant » des levures, par exemple égal à 0,25 g/kg eq MS (MS = matière sèche).

Un premier critère important est donc la capacité de la ou des souches de levures sélectionnées à croitre dans un milieu contenant comme seule source de carbone un pentose, en particulier le xylose, en présence d'un inhibiteur de type acide organique sous forme non dissociée, en particulier l'acide acétique.

Selon un autre mode de réalisation, le procédé de sélection peut comprendre une étape d'évaluation de la perte de masse en fonction du temps de fermentation dans le milieu de sélection et dans les conditions tels que définis ci-dessus. La mesure de la perte de masse de la fiole de fermentation est corrélée à la production d'alcool. Le suivi de cette perte de masse reflète donc la cinétique de fermentation du pentose, avantageusement le xylose, en présence d'un inhibiteur de type acide organique sous forme non dissociée, en particulier l'acide acétique.

Dans ces conditions et en présence du seul pentose comme source de carbone (pas de glucose), le profil attendu est monophasique, avec une cinétique associée de type ax + b lorsque le sucre est en concentration non limitante (au lancement de la culture). Dans le cadre de la sélection d'une souche avantageuse, notamment dans sa vitesse de fermentation des pentoses, en particulier du xylose, la valeur a (nombre positif) est aussi élevée que possible.

Par ailleurs, il est recherché une souche de levure capable de résister à l'acide acétique en milieu xylose, et ce y compris à des concentrations élevées en acide acétique. Ainsi, il peut être mesuré la vitesse maximale de production de CO_2 lors de la fermentation du xylose sur un milieu comme décrit précédemment mais contenant des concentrations variables en acide acétique du milieu de fermentation.

Pour une concentration donnée en acide acétique, il est privilégié que la souche sélectionnée présente une vitesse maximale de consommation du xylose, égale au double de la perte de masse en fermentation, plus importante que les souches déjà isolées, et ce quelle que soit la concentration en acide acétique (y compris en l'absence d'acide acétique), avantageusement dans la gamme de concentrations des milieux réels, par exemple entre 4 et 8 g/kg.

Par ailleurs et selon un autre mode de réalisation avantageux, il est vérifié que la capacité de la souche sélectionnée à fermenter le glucose (hexose) et le xylose (pentose) en présence de l'acide organique sous forme non dissociée, avantageusement l'acide acétique, n'est pas affectée. Il s'agit donc là d'analyser les caractéristiques de la

fermentation en général, dans un milieu proche des milieux réels contenant à la fois des hexoses et des pentoses.

En pratique, la fermentation est réalisée sur un milieu riche de type YFP, contenant du glucose, du xylose et de l'acide acétique, par exemple un milieu comprenant :

- extrait de levure, avantageusement à hauteur de 10 g/L ;
- bacto-peptone, avantageusement à hauteur de 10 g/L ;
- glucose, avantageusement à hauteur de 55 g/L ;
- xylose, avantageusement à hauteur de 45 g/L ;
- acide acétique, avantageusement avec une quantité introduite dans le milieu à hauteur de 5 g/L ;
- KOH.

Les conditions de culture sont celles adaptées à la croissance et à la fermentation des levures, avantageusement :

- un pH acide, avantageusement compris entre 4 et 6, encore plus avantageusement égal à 5 ;
- une température comprise entre 28 et 37°C, voire entre 30 et 35°C, avantageusement égale à 32°C ;
- sous faible agitation, par exemple égale à 100 rpm ;
- dans des conditions réduites d'apport en oxygène (sous O_2 limité ou en anaérobie) ;
- avec un temps de croissance d'au moins 24 heures, par exemple de 72 heures.

Le taux d'ensemencement doit être modéré pour éviter un effet « titrant » des levures, par exemple égal à 0,25 g/kg eq MS (MS = matière sèche).

Il est attendu un profil illustrant le double effet de l'acide acétique sur les levures aptes à fermenter le xylose et le glucose :

- Pendant la première phase, appelée « phase glucose », un retard d'initiation de la fermentation aussi réduit que possible, avantageusement inférieur à 24 heures, encore plus avantageusement de l'ordre de 5 à 6 heures. De manière privilégiée, la souche sélectionné n'a donc pas perdu de résistance vis-à-vis de l'acide acétique lors de la fermentation du glucose ;
- Lors de la fermentation du xylose, une cinétique aussi favorable que possible, c'est-à-dire aussi rapide et importante que possible, avec des performances meilleures que les souches de l'art antérieur.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé selon l'invention est mis en œuvre sur une souche de levures présentant des propriétés intéressantes dans le cadre de l'application visée :

- une bonne croissance dans les milieux synthétiques et naturels ;
- une capacité à fermenter le glucose y compris, de manière avantageuse, en présence d'un acide organique sous forme non dissociée, en particulier d''acide acétique ;
- une capacité à fermenter le xylose y compris, de manière avantageuse, en présence d'un acide organique sous forme non dissociée, en particulier d'acide acétique ;
- et avantageusement une inhibition réduite de la voie de fermentation du glucose par l'acide acétique.

De telles souches sont par exemple choisies dans le groupe suivant :

- souche déposée à la CNCM en date du 5.10.2011 sous le numéro I-4538 ;
- souche déposée à la CNCM en date du 16.05.2013 sous le numéro I-4749 ;
- souche déposée à la CNCM en date du 12.12.2013 sous le numéro I-4829 ;
- souche déposée à la CNCM en date du 9.04.2015 sous le numéro I-4966.

Des souches privilégiées sont la souche déposée à la CNCM en date du 12.12.2013 sous le numéro I-4829 et/ou la souche déposée à la CNCM en date du 9.04.2015 sous le numéro I-4966.

De préférence, les souches sélectionnées à l'issue du procédé selon l'invention conservent les caractéristiques d'intérêt des souches utilisées pour la mise en œuvre dudit procédé.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une souche de levure obtenue à l'aide du procédé décrit ci-dessus.

De manière remarquable, une telle souche présente une capacité à fermenter le xylose en présence d'acide acétique encore jamais égalée.

Cette capacité est avantageusement mesurée dans les conditions suivantes :

Une préculture de la souche est réalisée en milieu liquide, avantageusement dans un milieu synthétique favorable à la croissance des levures, tel que le milieu YPG, et dans les conditions décrites en rapport avec le second milieu mis en œuvre dans le procédé décrit ci-dessus.

Après 24 à 72 heures de culture à 30°C, la souche est transférée dans un milieu de croissance tel que le premier milieu de croissance du procédé selon l'invention. Un tel milieu est avantageusement défini comme suit :

- extrait de levure (EXL), avantageusement à hauteur de 5 g/L ;
- di-amonium phosphate, avantageusement à hauteur de 4,7 g/L ;
- acide citrique, avantageusement à hauteur de 11,4 g/L ;
- citrate tri-sodique, avantageusement à hauteur de 13,5 g/L ;
- $ZnSO_4$, avantageusement à hauteur de 21,2 mg/L ;
- $MgSO_4\,7H_2O$, avantageusement à hauteur de 1 g/L ;
- Thiamine, avantageusement à hauteur de 18,24 mg/L ;
- Pyridoxine, avantageusement à hauteur de 5,28 mg/L ;
- Biotine, avantageusement à hauteur de 1,76 g/L ;
- Panthoténate, avantageusement à hauteur de 3,8 mg/L ;
- acide nitotinique, avantageusement à hauteur de 20 mg/L ;
- myo-inositol, avantageusement à hauteur de 50 mg/L ;
- riboflavine, avantageusement à hauteur de 1 mg/L ;
- para-amino-benzoate, avantageusement à hauteur de 1,2 mg/L ;
- tween 80, avantageusement à hauteur de 1 g/L.

Il contient en outre du xylose en tant que seule source de carbone, à une concentration avantageusement égale à 50 g/L et des concentrations variables en acide acétique allant préférentiellement de 0 à 10 g/L de manière à pouvoir établir une courbe effet/dose. Il s'agit ici de valeurs de quantités d'acide acétique introduites dans le milieu de culture à pH 5.

Les conditions d'ensemencement et de culture sont avantageusement les suivantes :

- un pH acide, avantageusement compris entre 4 et 6, voire 4,5 et 5,5, encore plus avantageusement égal à 5 ;
- une température comprise entre 28 et 37°C, voire entre 30 et 35°C, avantageusement égale à 32°C ;
- sous faible agitation, par exemple égale à 100 rpm;
- dans des conditions réduites d'apport en oxygène (sous O_2 limité ou en anaérobie) ;
- un temps de croissance d'au moins 24 heures, avantageusement de 72 heures ;
- avec un taux d'ensemencement avantageusement égal à 0,25 g/kg eq MS (MS = matière sèche).

A l'issue de cette culture, la vitesse maximale de production de CO_2 est déterminée pour chaque concentration en acide acétique.

Dans ces conditions, il a été rapporté pour la première fois la sélection de souches de levures présentant la caractéristique suivante, jamais obtenue par les souches de l'art antérieur : La dose d'acide acétique nécessaire pour réduire de 50% sa cinétique de consommation du xylose est supérieure à 2,5 g/L en milieu liquide (2,5 g/kg en milieu solide), voire 3 g/L, voire supérieure ou égale à 3,5 g/L, avantageusement supérieure ou égale à 4 g/L, voire même supérieure ou égale à 5 g/L. Il s'agit ici de valeurs de quantités d'acide acétique introduites dans le milieu de culture à pH 5.

En pratique, il en résulte une cinétique de fermentation du xylose plus rapide en milieux réels, comprenant typiquement entre 2 et 8 g/kg d'acide acétique. Ainsi et en présence d'une souche selon l'invention, il est possible d'envisager une fermentation totale des sucres en présence en moins de 72 heures, avantageusement entre 48 et 72 heures.

Selon un mode de réalisation particulier, la souche de levure visée par l'invention comprend au moins une copie d'un gène exogène codant la xylose isomérase, avantageusement de *Clostridium phytofermentans*. Dans le cadre de l'invention, on entend par « exogène » le fait que le gène provient d'un autre organisme.

Selon un autre mode de réalisation particulier, la souche de levure visée par l'invention comprend au moins une copie surnuméraire du gène *GAL2* codant un transporteur des hexoses également capable d'assurer la capture du xylose. Selon un autre mode de réalisation, ladite souche comprend au moins deux copies surnuméraires du gène *GAL2*. Celui-ci peut être placé sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif de type pADH1.

Selon d'autres modes de réalisation particuliers, la souche de levure visée par l'invention présente une ou plusieurs caractéristiques choisies dans le groupe suivant :

- la suppression de l'activité aldose réductase (GRE3) ;
- la surproduction de la xylulokinase (XKS1), notamment par modification du promoteur ou introduction de copies surnuméraires ;
- l'expression ou la surproduction de la voie des pentoses phosphates (RPE1, RKl1, TKL1, TAL1, ...) ;
- l'absence d'activité xylose réductase (XR) ;
- la capacité à fermenter l'arabinose, avantageusement grâce à l'introduction de voie bactérienne telle que décrit dans WO 2008/041840 ou EP 1 499 708.

Selon un mode de réalisation avantageux, la souche de levure visée par la présente invention appartient au groupe des hemi-ascomycètes. Des souches privilégiées appartiennent au genre *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* ou *Yarrowia*, avantageusement *Saccharomyces*. Parmi les *Saccharomyces*, il s'agit avantageusement de *Saccharomyces cerevisiae*.

Comme démontré dans le cadre de la présente demande, une souche conforme à l'invention est la souche déposée auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) sous le numéro I-4953 en date du 29 Janvier 2015.

Dans le cadre de l'invention, on entend par « souche de levure » une population de levures rigoureusement identique du point de vue génétique. Cela englobe aussi bien les souches dites de laboratoire que les souches dites industrielles.

Selon un autre aspect, la présente invention vise également une levure obtenue par culture d'une souche telle que définie ci-dessus.

Dans le cadre de l'invention, on entend par « levure » un produit commercial obtenu grâce à la mise en œuvre d'un procédé de production d'une souche de levure. Ainsi, des levures présentant des caractéristiques différentes peuvent être obtenues à partir d'une même souche, ces différences étant liées au procédé de production mis en œuvre.

Selon un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une souche ou d'une levure telle que définie ci-dessus pour la fermentation d'un matériau, contenant avantageusement du xylose et/ou du glucose, et/ou pour la production d'éthanol. Selon un mode de réalisation particulier, le matériau est un matériau lignocellulosique. Un tel matériau contient typiquement :

- des pentoses, en particulier D-xylose et L-arabinose ;
- des hexoses, en particulier du D-mannose, du D-galactose, du L-rhamnose et du D-glucose ;
- des acides uroniques.

Selon un aspect particulier, l'invention a trait à un procédé de production de produits de fermentation ou d'éthanol comprenant les étapes suivantes :

- Incubation d'un matériau ou milieu contenant du xylose avec une souche ou une levure telle que définie ci-dessus ;
- Fermentation en condition anérobie ou semi-anaérobie ;
- Récupération du ou des produits de fermentation, ou de l'éthanol.

Selon un mode de réalisation particulier de ce procédé, le matériau ou milieu contient également du glucose.

La présente invention va être illustrée plus avant à l'aide des exemples de réalisation qui suivent, à l'appui des figures annexées. Toutefois, ceux-ci n'ont aucune portée limitative.

LEGENDES DES FIGURES :

La figure 1 représente l'évolution de la perte de masse (exprimée en g/kg) en fonction du temps de fermentation de différentes souches, dans un milieu contenant du xylose à 50 g/L et de l'acide acétique à 5 g/L à pH = 5.

La figure 2 représente l'impact de la concentration en acide acétique (exprimée en g/L à pH 5) sur la vitesse de perte de masse (production du CO_2 à partir du xylose), lors de la fermentation de différentes souches, dans un milieu contenant du xylose à 50 g/L.

La figure 3 représente l'évolution de la perte de masse (exprimée en g/kg) en fonction du temps de fermentation de différentes souches, dans un milieu contenant du glucose à 55 g/L, du xylose à 45 g/L et de l'acide acétique à 5 g/L (à pH 5).

EXEMPLES DE REALISATION

I/ Matériel et Méthodes :

1/ Souche :

Levure : *Saccharomyces cerevisiae*

Souche : I-4829 ou I-4966

2/ Milieux et conditions de culture :

2-a/ Evolution dirigée :

Milieu 1: YFX50 =

- xylose 50 g/L ;
- extrait de levure (EXL) 5 g/L ;
- di-amonium phosphate 4,7 g/L ;
- acide citrique 11,4 g/L ;
- citrate tri-sodique 13,5 g/L ;
- $ZnSO_4$ 21,2 mg/L ;
- $MgSO_4$ $7H_2O$ 1 g/L ;
- thiamine 18,24 mg/L ;

- pyridoxine 5,28 mg/L ;
- biotine 1,76 g/L ;
- panthoténate 3,8 mg/L ;
- acide nitotinique 20 mg/L ;
- myo-inositol 50 mg/L ;
- riboflavine 1 mg/L ;
- para-amino-benzoate 1,2 mg/L ;
- tween 80 1 g/L.

Les levures sont cultivées dans ce milieu avec le xylose comme seule source de carbone, et de l'acide acétique dont la concentration augmente au cours des cycles (voir section Résultats).

Le pH du milieu est maintenu à 5.

La culture est réalisée à 32°C sous une agitation de 100 rpm dans des fioles obturées par des bouchons qui permettent de réduire l'apport d'oxygène dans le milieu et de laisser échapper le CO_2 en surpression qui est produit tout au long de cette culture. La culture dure environ 7 jours dans ces conditions.

Milieu 2 (YPG) :

- 10 g/L d'extrait de levure ;
- 10 g/L de peptone ;
- 20 g/L de glucose comme seule source de carbone.

La culture est réalisée à 30°C sous une agitation à 150 rpm dans des fioles à baffles obturées par des bouchons poreux qui permettent l'apport d'oxygène dans le milieu. La culture dure environ 24 heures dans ces conditions.

Milieu 3 :

- 3,4 g / L de « yeast nitrogen base » DIFCO® ;
- 5 g / L sulfate d'ammonium ;
- 10 g/ L de glycérol comme seule source de carbone.

La culture est réalisée à 30°C sous une agitation à 150 rpm dans des fioles à baffles obturées par des bouchons poreux qui permettent l'apport d'oxygène dans le milieu. La culture dure environ 24 à 48 heures dans ces conditions.

2-b/ Sélection des souches les plus performantes :

A l'issue du 8ème cycle, les cellules ont été étalées à hauteur de 2000 cellules par boite (150 mm de diamètre) de milieu gélosé (YPG + agar).

Les colonies ainsi obtenues ont ensuite été cultivées en format Deep Well (= microplaque à 96 puits) dans du milieu YPG.

Après 72 heures de culture à 30°C, les colonies ont été transférées dans du milieu YFX50-Ac-5000 dont la composition est indiquée ci-dessous :

YFX50-Ac-5000	g / kg	mL / kg
Eau distillée qsp	1000	
Xylose	50	
EXL type J	5	
DAP	4,7	
Acide citrique	11,4	
Citrate trisodique	13,5	
Acide Acétique	5	
pH 5		
ZnSO4(10,6g/L)		2
MgSO4 7H2O (400g/L)		2,5
Thiamine Vit B1 (18,24g/L)		1
Pyrodixine Vit B6(5,28g/L)		1
Biotine(1,76g/L) +KOH		1
Panthoténate (3,8g/L)		1
Acide nicotinique (8g/L)		2,5
Mésoinositol (50g/L)		1
Riboflavine (1g/L)		1
Para aminobenzoate (1.2g/L)		1
Tween 80		1

En pratique, il s'agit du même milieu de culture que le premier milieu de croissance utilisé dans le procédé selon l'invention, avec une concentration en acide acétique (quantité introduite dans le milieu de culture à pH 5) égale à 5 g/L.

De même, les conditions de culture sont similaires :

Conditions :

pH : 5

Température : 32 °C

Conditions en O_2 : sans apport d'oxygène (anaérobie)

Agitation : 100 rpm

Durée de la culture : 72 heures

Préculture / Incubation :

- Reprise des colonies pour les cultures liquides en Deep Well (microplaques à 96 puits) ;
- 0,25 g/kg eq MS pour les cultures liquides.

2-c/ Validation des souches isolées :

Milieu : YFP-5000

- 10 g/L d'extrait de levure ;
- 10 g/L de bacto-peptone ;
- 55 g/L de glucose;
- 45 g/L de xylose;
- 5 g/L d'acide acétique (quantité introduite dans le milieu de culture à pH 5);
- KOH.

Conditions:

pH : 5

Température : 32°C

Conditions en O2 : sans apport d'oxygène

Agitation : 100 rpm

Durée de la culture : jusqu'à 72 heures

Préculture / Incubation : 0,25 g/kg eq MS des levures préalablement propagées en milieu YPG.

3/ Evaluation de la perte de masse :

La production d'éthanol est mesurée de manière indirecte par une mesure de la perte de masse de la fiole de fermentation, cette perte de masse étant directement corrélée à la production d'alcool. Elle est exprimée en g par kg de milieu.

4/ Evaluation de la vitesse de production du CO_2 :

A partir de la détermination de la perte de masse (correspondant à la production de CO_2), il est possible de déterminer la vitesse de consommation du xylose (exprimée en g/L) qui est le double de la perte de masse.
La vitesse maximale de production de CO_2 est exprimée en $g.kg^{-1}.h^{-1}.g^{-1}$ de MS (matière sèche).

II/ Résultats :

1/ Sélection des souches d'intérêt :

1-a/ Evolution dirigée :

L'évolution dirigée a été réalisée en mode SBR (« Single Batch Repeat ») :

- Cycles 1 à 3 : milieu 1 à 3 g/L en acide acétique (ajouté dans le milieu à pH 5) puis milieu 2 puis milieu 3 ;
- Cycles 4 à 6 : milieu 1 à 4 g/L en acide acétique puis milieu 2 puis milieu 3 ;
- Cycle 7 : milieu 1 à 5 g/L en acide acétique puis milieu 2 puis milieu 3 ;
- Cycle 8 : milieu 1 à 6 g/L en acide acétique puis milieu 2 puis milieu 3.

1-b/ Sélection des souches les plus performantes :

Après isolement des clones sur milieu solide et leur préculture en milieu liquide, celles-ci sont ensemencées dans des microplaques de type Deep Well contenant du milieu YFX50-Ac-5000 (50 g/kL de xylose et 5 g/L d'acide acétique à pH = 5).

Après 72 heures de fermentation dans ce milieu, les souches sélectionnées (16 au total) sont celles présentant la meilleure croissance, par analyse de la densité cellulaire du milieu. Les souches CNCM I-4071 et CNCM I-4829 ont servi respectivement de témoin négatif et positif en regard de la capacité des cellules à utiliser le xylose pour faire leur croissance.

Ces 16 souches ont été évaluées d'un point de vue cinétique sur ce même milieu. Les résultats sont présentés à la Figure 1, qui représente la perte de masse en fonction du temps de fermentation. De manière attendue dans la mesure où ce milieu contient uniquement du xylose (pas de glucose), le profil observé pour toutes les souches testées est monophasique. En revanche, il apparaît que la dérivée à l'origine de la courbe varie en

fonction des souches. Celle-ci peut être formulée à l'aide de l'équation ax + b, avec a qui varie selon les souches.

La figure 1 révèle que la souche E9 présente les meilleures performances. Cette souche a été déposée auprès de l'Institut Pasteur (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) sous le numéro CNCM I-4953 en date du 29 janvier 2015 et a été utilisée dans la suite des expériences.

2/ Propriétés de la souche I-4953 :

2-1/ En milieu xylose :

La première étape a consisté à déterminer l'impact de l'évolution dirigée sur la capacité de cette souche à résister à l'acide acétique lors de la fermentation du xylose. Pour cela, le test a consisté à mesurer la vitesse maximale de production de CO_2 lors de la fermentation du xylose sur un milieu YFX50-Ac. Afin d'obtenir une courbe effet/dose, différentes concentrations en acide acétique ont été ajoutées dans le milieu de fermentation.

La figure 2 montre que cette souche a une vitesse maximale de consommation du xylose, égale au double de la perte de masse en fermentation, qui est environ 15% plus importante que celle de la souche I-4829 en absence d'acide acétique. Cet écart est encore plus important quand la dose d'acide acétique est de 4 g/L. En effet, à cette concentration, la vitesse de consommation du xylose est réduite de 85% pour la souche I-4829, contre seulement 15% pour la souche I-4953. Cela signifie qu'en présence d'acide acétique à 4 g/L et à pH 5, la souche I-4953 a la même vitesse de consommation du xylose que la souche I-4829 en absence d'acide acétique.

2-2/ En milieu glucose + xylose :

Afin de mieux appréhender l'impact de l'évolution dirigée sur la fermentation en générale, la perte de masse en fonction du temps de fermentation a été suivie sur un milieu contenant du glucose, du xylose et de l'acide acétique.

Les résultats sont présentés à la figure 3, qui illustre clairement le double effet de l'acide acétique sur les levures aptes à fermenter le xylose :

- Pendant la première phase, appelée « phase glucose », la souche I-4538 présente un retard d'initiation de la fermentation d'environ 24 heures. Pour les autres souches (I-4749, I-4829 et I-4953), le lag n'est que de 5 à 6 heures. Ce

constat signifie que la souche isolée n'a pas perdu de résistance vis-à-vis de l'acide acétique lors de la fermentation du glucose ;

- Lorsque la fermentation du xylose prend le relais, les cinétiques des souches I-4538, I-4749 et I-4829 sont comparables. En revanche, pour la souche I-4953, il est notable que la production de CO_2 (et par conséquent celle d'éthanol) est plus rapide et importante que celle observée pour les 3 autres souches.

Ces résultats confirment l'obtention d'une souche plus résistante vis-à-vis de l'acide acétique lors de la fermentation du xylose, et donc globalement plus performante.

III/ Conclusions :

Le procédé décrit a donc permis de sélectionner au moins une souche stable, I-4953, qui a conservé sa capacité à fermenter le glucose avec un retard d'initiation limité, tout en présentant une cinétique de fermentation du xylose en présence d'acide acétique améliorée.

REVENDICATIONS

1. Procédé de sélection d'une souche de levure présentant une capacité améliorée à fermenter un pentose, avantageusement le xylose, en présence d'acide organique, avantageusement d'acide acétique, sous forme non dissociée,
dans lequel au moins une souche de levure présentant une capacité à fermenter ledit pentose est cultivée successivement dans les 2 milieux suivants :
   - un premier milieu de croissance comprenant comme seule source de carbone ledit pentose et ledit acide organique sous forme non dissociée ;
   - un deuxième milieu de croissance comprenant comme seule source de carbone une autre source de carbone, avantageusement du glucose, et dépourvu dudit acide organique sous forme non dissociée,

   la culture successive dans au moins ces deux milieux de croissance étant répétée au moins deux fois, en présence de concentrations croissantes en acide organique sous forme non dissociée.

2. Procédé de sélection d'une souche de levure selon la revendication 1, ***caractérisé*** en ce que, après la culture dans les deux premiers milieux de croissance, une culture est réalisée en aérobiose dans un milieu minimum contenant comme seule source de carbone une source de carbone respiratoire stricte, avantageusement du glycérol.

3. Procédé de sélection d'une souche de levure selon la revendication 1 ou 2, ***caractérisé*** en ce que la culture de la souche, successivement dans les deux ou trois milieux de croissance, est répétée plus de 2 fois mais moins de 10 fois, avantageusement 8 fois.

4. Procédé de sélection d'une souche de levure selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce que la concentration du premier milieu de croissance en acide organique, avantageusement en acide acétique, sous forme non dissociée est comprise entre 1,3 et 2,6 g/L.

5. Procédé de sélection d'une souche de levure selon l'une des revendications précédentes, ***caractérisé*** en ce que la souche de levure présentant une capacité à métaboliser ledit pentose est choisie dans le groupe suivant : I-4538, I-4749, I-4829 et I-4966, avantageusement I-4829 et/ou I-4966.

6. Souche de levure susceptible d'être obtenue à l'aide du procédé selon l'une des revendications 1 à 5 ***caractérisée*** en ce qu'elle présente la caractéristique suivante : la dose d'acide acétique à introduire dans un milieu à pH 5 nécessaire pour réduire de 50% sa cinétique de consommation du xylose est supérieure à 3 g/L, voire supérieure ou égale à 3,5 g/L, voire même supérieure ou égale à 4 g/L.

7. Souche de levure selon la revendication 6 ***caractérisée*** en ce qu'elle comprend au moins une copie d'un gène exogène codant une xylose isomérase, avantageusement de *Clostridium phytofermentans*.

8. Souche de levure selon la revendication 6 ou 7 ***caractérisée*** en ce qu'elle comprend au moins une copie surnuméraire du gène *GAL2*.

9. Souche de levure selon l'une des revendications 6 à 8 ***caractérisée*** en ce qu'elle appartient au groupe des *Saccharomyces*, avantageusement *Saccharomyces cerevisiae*.

10. Souche de levure selon la revendication 9 ***caractérisée*** en ce qu'elle a été déposée auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) sous le numéro I-4953 en date du 29 Janvier 2015.

11. Levure obtenue par culture d'une souche selon l'une des revendications 6 à 10.

12. Utilisation d'une souche selon l'une des revendications 6 à 10 ou d'une levure selon la revendication 11 pour la fermentation d'un matériau, contenant avantageusement du xylose, et/ou pour la production d'éthanol.

13. Procédé de production de produits de fermentation ou d'éthanol comprenant les étapes suivantes :
    - Incubation d'un matériau ou milieu contenant du xylose avec une souche selon l'une des revendications 6 à 10 ou une levure selon la revendication 11 ;
    - Fermentation en condition anaérobie ou semi-anaérobie ;
    - Récupération du ou des produits de fermentation, ou de l'éthanol.

14. Procédé de production de produits de fermentation ou d'éthanol selon la revendication 13, ***caractérisé*** en ce que le matériau ou milieu contient également du glucose.

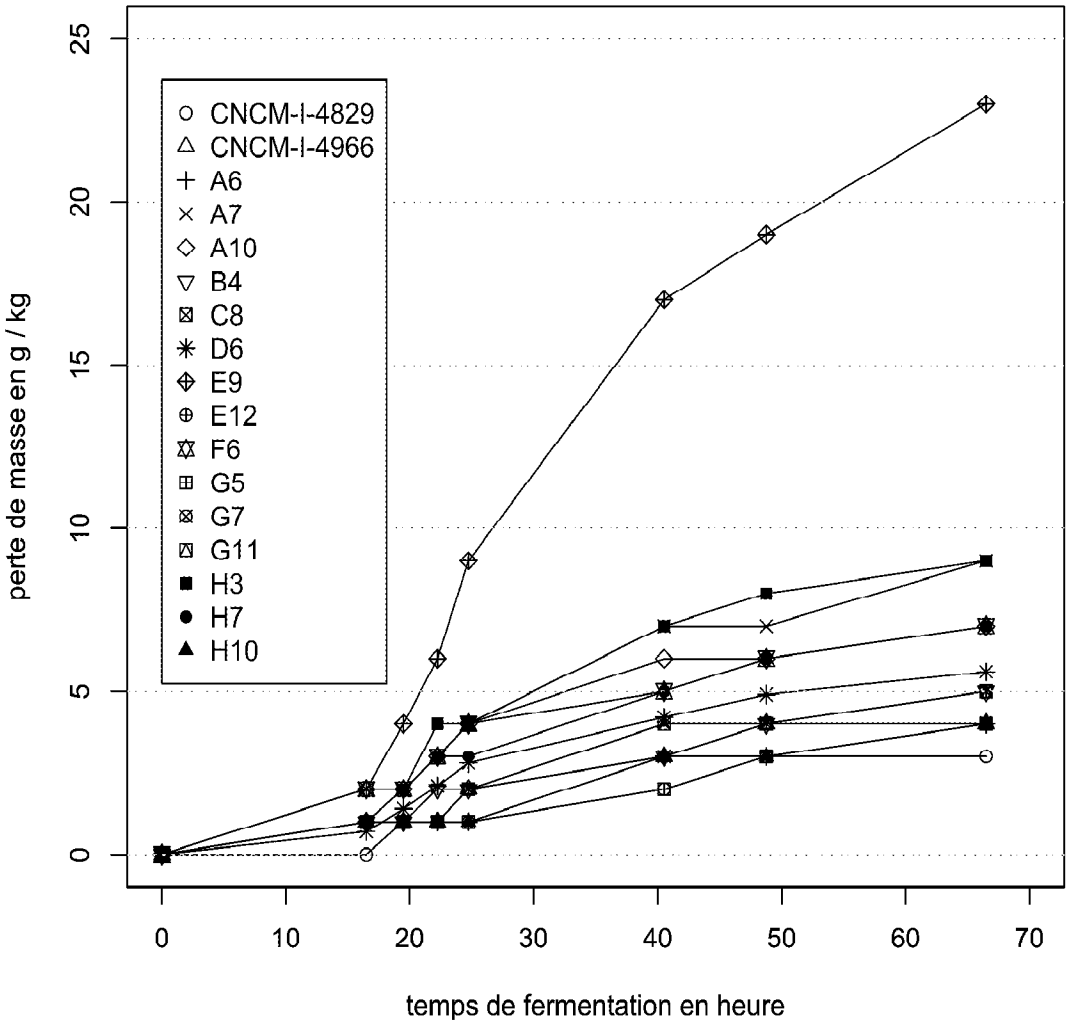

perte de masse en g / kg
temps de fermentation en heure
0
5
10
15
20
25
0
10
20
30
40
50
60
70
CNCM-I-4829
CNCM-I-4966
A6
A7
A10
B4
C8
D6
E9
E12
F6
G5
G7
G11
H3
H7
H10

Figure 1

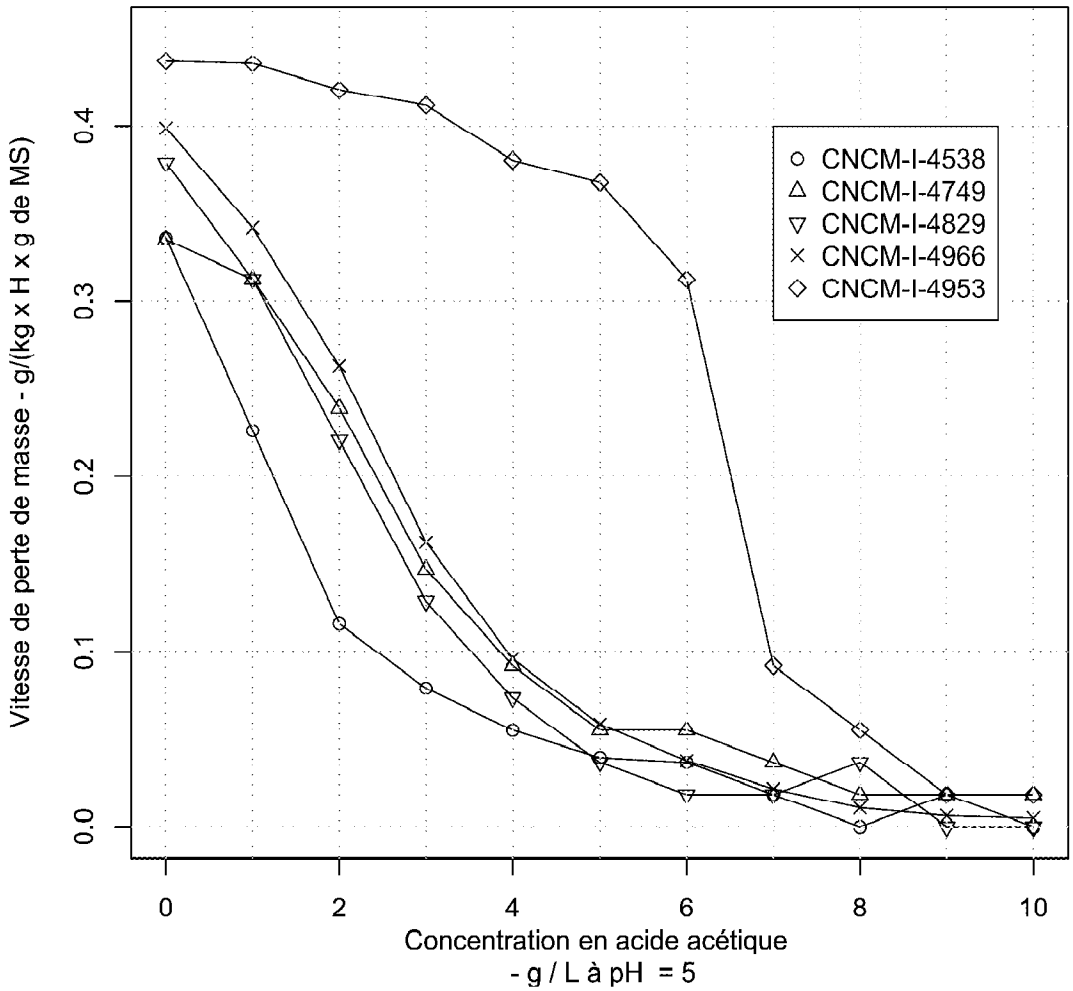

Vitesse de perte de masse - g/(kg x H x g de MS)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0
2
4
6
8
10
Concentration en acide acétique
- g / L à pH = 5
CNCM-I-4538
CNCM-I-4749
CNCM-I-4829
CNCM-I-4966
CNCM-I-4953

Figure 2

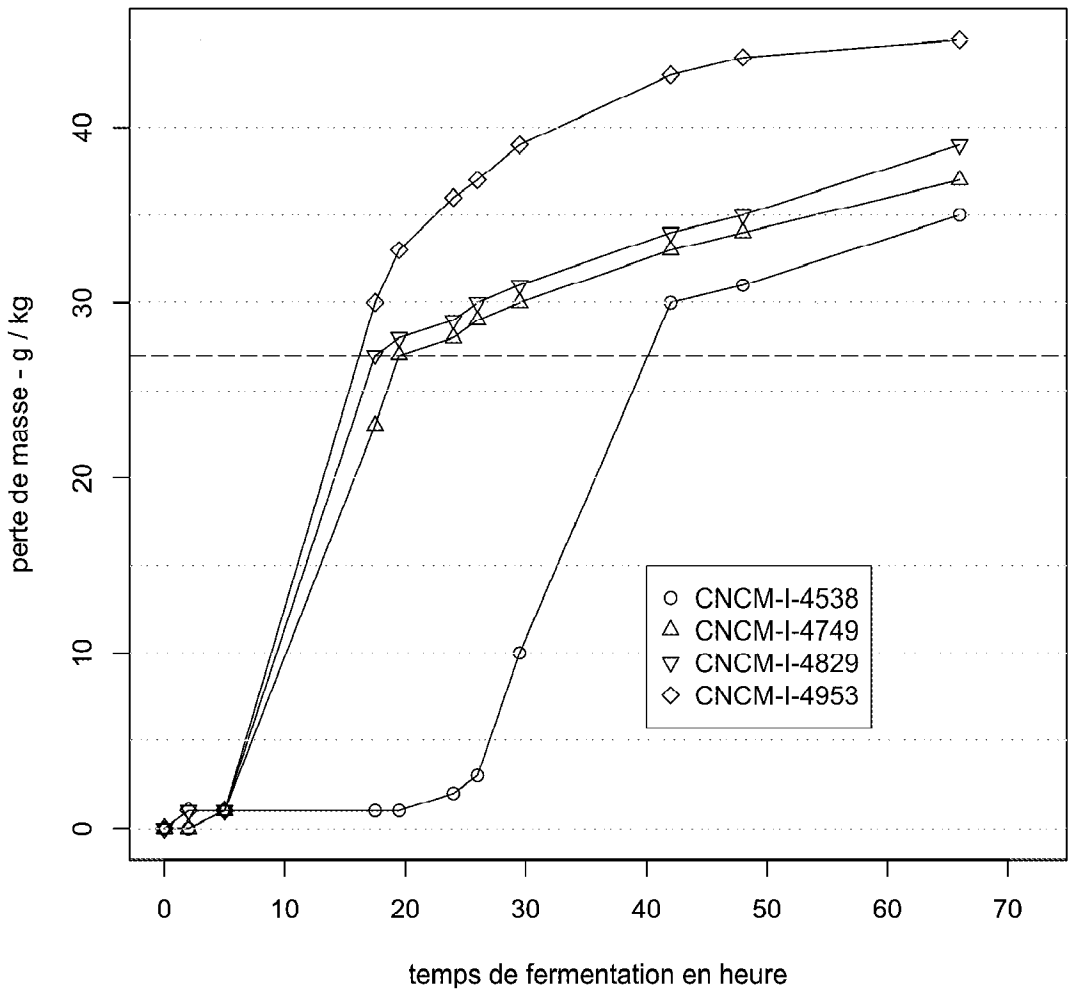

perte de masse - g / kg
0
10
20
30
40
0
10
20
30
40
50
60
70
temps de fermentation en heure
CNCM-I-4538
CNCM-I-4749
CNCM-I-4829
CNCM-I-4953

Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/050987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/18 C12N1/19 C12N1/36 C12P7/10
ADD. C12R1/865

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12R C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/178915 A1 (LESAFFRE & CIE [FR]) 5 December 2013 (2013-12-05)	6-14
A	paragraph [0217] - paragraph [0250]; claims 1-14	1-5

X	JEREMIAH WRIGHT ET AL: "Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting Saccharomyces cerevisiae", FEMS YEAST RESEARCH, vol. 11, no. 3, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 299-306, XP055202939, ISSN: 1567-1356, DOI: 10.1111/j.1567-1364.2011.00719.x	6-14
A	the whole document	1-5

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 June 2016	30/06/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Devijver, Kristof

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/050987

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/159560 A1 (DONALDSON JENNIFER [CA] ET AL) 30 June 2011 (2011-06-30) claims 26-29 -----	8

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2016/050987

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013178915 A1	05-12-2013	AU 2013269482 A1	15-01-2015
		CA 2874831 A1	05-12-2013
		CN 104640976 A	20-05-2015
		EP 2855711 A1	08-04-2015
		FR 2991339 A1	06-12-2013
		JP 2015521043 A	27-07-2015
		US 2015104822 A1	16-04-2015
		WO 2013178915 A1	05-12-2013
US 2011159560 A1	30-06-2011	BR 112012018764 A2	15-09-2015
		CA 2779163 A1	07-07-2011
		CN 102947440 A	27-02-2013
		EP 2519626 A1	07-11-2012
		US 2011159560 A1	30-06-2011
		US 2014030795 A1	30-01-2014
		WO 2011079388 A1	07-07-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2016/050987

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N1/18 C12N1/19 C12N1/36 C12P7/10
ADD. C12R1/865

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N C12R C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2013/178915 A1 (LESAFFRE & CIE [FR]) 5 décembre 2013 (2013-12-05)	6-14
A	alinéa [0217] - alinéa [0250]; revendications 1-14	1-5

X	JEREMIAH WRIGHT ET AL: "Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting Saccharomyces cerevisiae", FEMS YEAST RESEARCH, vol. 11, no. 3, 1 mai 2011 (2011-05-01), pages 299-306, XP055202939, ISSN: 1567-1356, DOI: 10.1111/j.1567-1364.2011.00719.x	6-14
A	le document en entier	1-5

	-/--	

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
23 juin 2016	30/06/2016

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Devijver, Kristof

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2016/050987

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2011/159560 A1 (DONALDSON JENNIFER [CA] ET AL) 30 juin 2011 (2011-06-30) revendications 26-29	8

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2016/050987

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013178915 A1	05-12-2013	AU 2013269482 A1	15-01-2015
		CA 2874831 A1	05-12-2013
		CN 104640976 A	20-05-2015
		EP 2855711 A1	08-04-2015
		FR 2991339 A1	06-12-2013
		JP 2015521043 A	27-07-2015
		US 2015104822 A1	16-04-2015
		WO 2013178915 A1	05-12-2013
US 2011159560 A1	30-06-2011	BR 112012018764 A2	15-09-2015
		CA 2779163 A1	07-07-2011
		CN 102947440 A	27-02-2013
		EP 2519626 A1	07-11-2012
		US 2011159560 A1	30-06-2011
		US 2014030795 A1	30-01-2014
		WO 2011079388 A1	07-07-2011