

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 397**

51 Int. Cl.:
C12N 15/04 (2006.01)
C12N 1/18 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05746690 .6**
96 Fecha de presentación: **08.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1766007**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **CEPAS DE SACCHAROMYCES NO RECOMBINANTES QUE CRECEN EN XILOSA.**

30 Prioridad:
08.06.2004 AU 2004903141

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2012

73 Titular/es:
**Microbiogen Pty Ltd
C/o Peter H.Hunt & Associates Level 13 74
Castlereagh Street
Sydney, NSW 2000, AU**

72 Inventor/es:
**BELL, Philip, John, Livingstone y
ATTFIELD, Paul, Víctor**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 373 397 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

Cepas de *saccharomyces* no recombinantes que crecen en xilosa.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos para producir cepas de *Saccharomyces* no recombinantes, cepas de *Saccharomyces*, y a usos de las mismas.

10 **Antecedentes de la invención**

Uno de los grupos económicos más importantes de levaduras son los del género *Saccharomyces*, cuyas cepas se emplean en la elaboración de cerveza, pan, vino, destilería y otras diversas industrias dependientes de levaduras. Las especies de *Saccharomyces* se definieron filogenéticamente por Kurtzman (2003) FEMS Yeast Research 3:417-432, e incluyen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. bayanus*. *Saccharomyces* spp. son algunos de los microorganismos más eficaces para transformar azúcares, tales como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, en biomasa y para fermentar estos azúcares en etanol. Como consecuencia de ello, *Saccharomyces* spp., y en particular *Saccharomyces cerevisiae*, es uno de los microorganismos más ampliamente usados en los procesos industriales. Por ejemplo, en la elaboración de cerveza y en las industrias del vino y destilería, *Saccharomyces* se usa para fermentar azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa y/o maltosa en etanol. En la industria del etanol combustible, se seleccionan cepas de *Saccharomyces cerevisiae* por su capacidad para transformar rápidamente grandes concentraciones de azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa en grandes cantidades de etanol. En la industria panificadora, se usan cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar el pan fundamentalmente por su capacidad para producir dióxido de carbono a partir de azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa, y/o maltosa. Otras aplicaciones de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen la producción de extractos de levadura y otros productos saporíferos y aromatizantes, fuentes de enzimas tales como invertasa, producción de diversos compuestos bioquímicos, productos intermedios, proteínas, aminoácidos, ácido ribonucleico y nucleótidos, cofactores y vitaminas.

En los procesos industriales, cada año, se cultivan millones de toneladas de levadura. Por lo tanto, la capacidad de *Saccharomyces* para crecer en fuentes abundantes y renovables de carbono es importante en términos de producción económica de biomasa de levadura para fines industriales y para la producción económica de productos secundarios del metabolismo de la levadura. En particular, la capacidad de *Saccharomyces* para crecer en productos secundarios de desecho de otros procesos industriales es de valor económico y medioambiental. Por tanto, por ejemplo, la biomasa de levadura de panadería se produce a menudo a partir del crecimiento de la levadura en melaza, que es un producto de desecho de los procesos de producción de azúcar, o en jarabes ricos en glucosa y maltosa derivados de la industria de la hidrólisis del almidón.

El documento EP 0066396 describe la fermentación directa de la D-xilosa en etanol mediante un mutante de levadura que fermenta la xilosa.

El documento WO 00/04190 describe la evolución de organismos y de células completas por recombinación de secuencia recurrente.

Heluane et. al. (1993) Applied Microbiology & Biotechnology, 40(1): 98-100, describen la caracterización de híbridos obtenidos por la fusión del protoplasto, entre *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Kuyper et. al. (2004) Fems Yeast Research, 4(6): 655-664, describen modificaciones mínimas por ingeniería genética metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación anaerobia eficaz de la xilosa.

Volfová et. al. (1979) Folia Microbiologica 24(2): 157-162, describen una selección de cepas de levaduras con utilización óptima de hidrolizados de la paja.

Richard et. al. (1999) Fems Letters, 457(1); páginas 135-138, describen pruebas de que el gen YLR070c de *Saccharomyces cerevisiae* codifica una xilitol deshidrogenasa.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para producir una o más cepas de *Saccharomyces* que sean capaces de crecer con una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento tal y como se indica en las reivindicaciones. La invención también proporciona una cepa aislada de *Saccharomyces* no recombinante tal y como se define en las reivindicaciones así como los usos de las mismas (como se define en las reivindicaciones). La invención también proporciona métodos para producir diversos compuestos tal y como se define en las reivindicaciones.

La xilosa es un ejemplo de azúcar abundante y renovable, de origen natural, disponible a partir de la biomasa de las plantas que se consideraba anteriormente que el *Saccharomyces* no podía utilizar. Véase por ejemplo, Barnett et. al.

'Yeasts Characteristics and Identification' 2ª edición (1990), Cambridge University Press, que indica que la levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* no es capaz de utilizar la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento. La xilosa representa una fuente con un gran potencial para el crecimiento de levaduras y de productos de fabricación a partir de levaduras, que incluye el etanol. El uso de xilosa como fuente de azúcar para las levaduras proporcionaría ventajas económicas y medioambientales de una gran importancia. Por ejemplo, la producción del etanol combustible a partir de materiales ricos en xilosa podría ser una fuente muy importante de energía renovable.

La presente memoria descriptiva describe un método de producción de una cepa de *Saccharomyces* que puede crecer con una tasa de crecimiento deseada empleando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, que comprende:

- (a) proporcionar una población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* no recombinante;
- (b) cultivar las células de levadura en condiciones que permitan combinar ADN entre células de levadura;
- (c) identificar o seleccionar las células de levadura para detectar células de levadura que hayan aumentado su tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento;
- (d) aislar una o más células de levadura que tengan la tasa de crecimiento deseada.

Generalmente, las células de levadura se cultivan en condiciones que permitan la combinación del ADN entre pares de células de levadura.

Generalmente, la tasa de crecimiento deseada es un aumento en la tasa de crecimiento con respecto al de las células de levadura de las cepas de *Saccharomyces* para el cual no se ha aplicado el método. Por ejemplo, cepas de *Saccharomyces* tales como la cepa NL67. Más generalmente, la tasa de crecimiento deseada es de al menos una generación cada 48 horas, más generalmente al menos una generación cada 24 horas.

Generalmente, las células de levadura se identifican o se seleccionan para detectar células de levadura que tengan la tasa de crecimiento deseada mediante incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa. Generalmente, el medio que contiene xilosa es un medio de cultivo que contiene xilosa. El medio de cultivo puede contener xilosa como única fuente de carbono, o la xilosa puede ser una de las diversas de fuentes de carbono. Generalmente, la xilosa es la única fuente de carbono en el medio que contiene xilosa. Generalmente, el medio de cultivo que contiene xilosa es un medio mínimo mineral con xilosa. Las células de levadura se incuban generalmente en o sobre el medio que contiene xilosa durante un tiempo suficiente que permita a las células de levadura alcanzar la tasa de crecimiento deseada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.

En una realización, las células de levadura identificadas o seleccionadas forman la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante, y las etapas (b) y (c) se repiten hasta que se obtienen las células de levadura con la tasa de crecimiento deseada.

En una realización, la etapa (b) se realiza antes que la etapa (c). En otra realización, la etapa (c) se realiza antes que la etapa (b). En otra realización más, las etapas (b) y (c) se realizan de modo simultáneo.

La presente memoria descriptiva desvela un método para la producción de una cepa de *Saccharomyces* en un cultivo que es susceptible de conseguir una tasa de crecimiento deseada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, que comprende:

- (a) proporcionar una población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* no recombinante;
- (b) cultivar las células de levadura en condiciones que permitan combinar ADN entre células de levadura;
- (c) identificar o seleccionar las células de levadura por incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa;
- (d) repetir las etapas (b) y (c) con las células identificadas o seleccionadas que forman la población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* no recombinante, hasta que una o más células de levadura hayan adquirido la capacidad de crecer con la tasa de crecimiento deseada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.

Generalmente, el método comprende la etapa adicional (e) de aislar una o más células de levadura que tengan la tasa de crecimiento deseada. La presente memoria descriptiva desvela que el aislamiento de una o más células de

levadura es una cepa sencilla de *Saccharomyces*. La presente memoria descriptiva desvela que el aislamiento de una o más células de levadura es una población genéticamente diversa de células de levadura.

5 La presente memoria descriptiva desvela que las células de levadura se seleccionan en la etapa (c). Las células de levadura se pueden seleccionar en la etapa (c) mediante la incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante el tiempo suficiente para permitir el crecimiento en la xilosa como fuente de carbono a las células de levadura capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono y a partir de entonces recoger las células de levadura que crecen. Las células de levadura se pueden seleccionar en la etapa (c) mediante la incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante un tiempo suficiente para permitir a las células de levadura que tengan una tasa de crecimiento aumentada usando xilosa como única fuente de carbono crecer usando xilosa como fuente de carbono, y a partir de entonces recoger las células de levadura que crecen.

15 La presente memoria descriptiva desvela que las células se identifican en la etapa (c). Las células de levadura se pueden identificar en la etapa (c) mediante la incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante un tiempo suficiente para permitir a las células de levadura que tengan una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono crecer usando la xilosa como fuente de carbono.

20 También se contempla que las células de levadura se seleccionen en una parte de las repeticiones de las etapas (b) y (c), y que en una parte de las repeticiones de las etapas (b) y (c), las células de levadura se identifiquen.

25 Las etapas (b) y (c) se pueden repetir el número de veces que sea suficiente para obtener una cepa de levadura que sea capaz de crecer con la tasa deseada usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento. Las personas expertas en la materia apreciarán que el número de veces que se repiten las etapas (b) y (c) dependerá del medio que se use, de las cepas de levadura de partida, de las condiciones de cultivo, etc. Generalmente, las etapas (b) y (c) se repiten al menos una vez, generalmente al menos 2 veces, más generalmente al menos 5 veces, incluso más generalmente al menos 10 veces, todavía más generalmente al menos 20 veces, apropiadamente al menos 30 veces.

30 Las células de levadura se pueden identificar o seleccionar en un medio sólido o líquido que contenga xilosa. En una realización, las células se pueden identificar o seleccionar en un medio sólido que contenga xilosa. En otra realización, las células se identifican o se seleccionan en un medio líquido que contenga xilosa. En otra realización más, las células se identifican o se seleccionan en un medio sólido que contenga xilosa, seguido de identificación o seleccionar en un medio líquido que contenga xilosa. Por ejemplo, las células de levadura se pueden identificar o seleccionar la mayoría de las veces por repetición de las etapas (b) y (c) usando un medio sólido que contenga xilosa, seguido la mayoría de las veces de una identificación o selección por repetición de las etapas (b) y (c) usando un medio líquido que contenga xilosa.

40 El medio sólido que contiene xilosa puede ser cualquier medio sólido que contenga xilosa como fuente de carbono, y que proporcione una ventaja selectiva a la cepa que sea capaz de utilizar la xilosa como única fuente de carbono. Por ejemplo, el medio sólido que contiene xilosa puede ser un medio sólido complejo en el que la xilosa sea una de las diversas fuentes de carbono, o el medio sólido que contiene xilosa puede ser un medio sólido mínimo en el que la xilosa es la única fuente de carbono. Generalmente, el medio sólido que contiene xilosa será un medio sólido mínimo en el que la xilosa es la única fuente de carbono.

50 El medio líquido que contiene xilosa puede ser cualquier medio líquido que contenga xilosa como fuente de carbono. Por ejemplo, el medio líquido que contiene xilosa puede ser un medio líquido complejo en el que la xilosa sea una de las diversas fuentes de carbono, o el medio líquido que contiene xilosa puede ser un medio líquido mínimo en el que la xilosa es la única fuente de carbono. Generalmente, el medio líquido que contiene xilosa será un medio líquido mínimo que contenga la xilosa como única fuente de carbono. Generalmente, el medio líquido mínimo es un medio mineral mínimo que contiene xilosa como única fuente de carbono.

55 Generalmente, la tasa de crecimiento deseada es de al menos una generación cada 48 horas. La tasa de crecimiento deseada puede ser superior a una generación cada 24 horas. La tasa de crecimiento deseada puede ser superior a una generación cada 12 horas. La tasa de crecimiento deseada puede ser superior a una generación cada 10 horas. La tasa de crecimiento deseada puede ser superior a una generación cada 8 horas. La tasa de crecimiento deseada puede ser superior a una generación cada 4 horas. La tasa de crecimiento deseada puede ser superior a una generación cada 2 horas.

60 La cepa de *Saccharomyces* que se produce puede ser una cepa de cualquiera de las especies del género *Saccharomyces* que sea capaz de crecer con la tasa de crecimiento deseada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento. Los expertos en la materia apreciarán que la cepa que se produzca dependerá de las especies que forman la población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* no recombinantes. Los ejemplos de especies adecuadas de levaduras incluyen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. bayanus*. Generalmente la cepa es de la especie *Saccharomyces*

cerevisiae. Generalmente la cepa será capaz de cruzarse con *Saccharomyces* de la misma especie. Generalmente la cepa será capaz de cruzarse con *Saccharomyces cerevisiae*.

5 La levadura se puede cultivar en cualquiera de las condiciones que permitan la combinación de ADN entre células de levadura siempre que la combinación de ADN no se haga usando métodos recombinantes. Las células de levadura se pueden cultivar en condiciones que permitan la combinación de ADN entre células de levadura, por ejemplo, mediante cruzamiento o citoducción, o cualquier otro método conocido en la técnica de combinación del ADN de las células de levadura, que no sean métodos de recombinación. En una realización, las células de levadura se cultivan en condiciones que permitan el cruzamiento de las células de levadura. Generalmente, el cruce de las levaduras comprende la esporulación de las levaduras para producir esporas, la germinación de las esporas, y el cruzamiento de las esporas germinadas. Los expertos en la materia conocen métodos de cruzamiento de las levaduras y se describen, por ejemplo, en Fowell (1969) "Sporulation and hybridization of yeast", en *The Yeasts* (AH Rose y JS Harrison, eds.), Academic Press; en la Patente Europea EP 0 511 108 B; en Atfield y Bell (2003) "Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts"; en *Topics in Current Genetics*, Vol 2, *Functional Genetics of Industrial Yeasts* (J.H. de Winde, ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg o en combinaciones de los mismos.

20 La población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante puede ser aislados de *Saccharomyces* de origen natural de cualquier fuente, aislados de *Saccharomyces* mutados espontáneamente, o se puede obtener por la exposición de una o más cepas de *Saccharomyces* a un agente mutagénico. La población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante puede ser cepas de una especie sencilla, o puede ser cepas de una diversidad de especies. Las especies adecuadas para su uso como población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante incluyen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. bayanus*. Generalmente las cepas son de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Generalmente las cepas son capaces de cruzarse con *Saccharomyces* de la misma especie. Generalmente las cepas son capaces de cruzarse con *Saccharomyces cerevisiae*.

30 Los expertos en la materia comprenderán que además de la población genéticamente divergente de las células de levadura no recombinante, se pueden incluir las células de levadura recombinante en las etapas (b) y (c) como una población aparte.

35 La presente memoria descriptiva desvela un método para generar un derivado de una cepa de *Saccharomyces* con una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, que comprende:

- (a) proporcionar células de levadura de la cepa como parte de una población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces*;
- 40 (b) cultivar la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces* en condiciones que permitan la combinación de ADN entre las células de levadura de la población;
- (c) identificar o seleccionar las células de levadura de derivados de la cepa que hayan incrementado su tasa de crecimiento en xilosa;
- 45 (d) aislar uno o más derivados de la cepa que hayan incrementado su tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento con relación a la tasa de crecimiento de la cepa que usa la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.

50 Generalmente las células de levadura se identifican o se seleccionan mediante la incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa.

55 La presente memoria descriptiva desvela que las células de levadura se seleccionan en la etapa (c). Las células de levadura se pueden seleccionar en la etapa (c) mediante la incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante un tiempo suficiente que permita, a las células de levadura capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono, crecer usando la xilosa como fuente de carbono. Las células de levadura se pueden seleccionar en la etapa (c) mediante la incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante un tiempo suficiente que permita a las células de levadura que tengan una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento crecer usando la xilosa como fuente de carbono.

60 La presente memoria descriptiva desvela que las células de levadura se identifican en la etapa (c). Las células de levadura se pueden identificar en la etapa (c) mediante la incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante un tiempo suficiente que permita a las células de levadura que tengan una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento crecer usando la xilosa como fuente de carbono, y a partir de entonces recoger las células de levadura que crezcan con la mayor rapidez usando la xilosa como fuente de carbono.

Generalmente, las etapas (b) y (c) se pueden repetir, mediante lo cual los derivados forman al menos una parte de la población genéticamente diversa de las cepas de *Saccharomyces*, hasta que uno o más derivados hayan adquirido una tasa de crecimiento aumentada en xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.

5 En el pasado, para abordar el problema de la incapacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para usar la xilosa, otros habían usado estrategias de ADN recombinante para introducir los genes obtenidos a partir de la levadura que puede utilizar la xilosa como fuente de carbono para conferir a *Saccharomyces* la capacidad de usar xilosa (por ejemplo, Sonderegger y Sauer (2003) Applied and Environmental Microbiology 69: 1990-1998). Con estas
10 estrategias, se han clonado los genes para la utilización de la xilosa partiendo de organismos capaces de utilizar la xilosa para su crecimiento, y posteriormente se introdujeron en *Saccharomyces cerevisiae*. Por ejemplo, la xilosa isomerasa fúngica de *Piromyces* spp. se ha integrado en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* para producir cepas que crezcan lentamente en xilosa como única fuente de carbono (Kuyper *et al.* 2003). También se ha clonado
15 en *Saccharomyces cerevisiae* la xilosa reductasa de *Pichia stipitis* para producir levaduras que puedan utilizar la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento (Wahlbom *et al.* 2003).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* no recombinante se "considera generalmente segura" (GRAS, por las siglas en inglés, *Generally Regarded As Safe*) y si se usan técnicas de recombinación para el desarrollo de
20 *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza xilosa, pierden el estado GRAS. Por lo tanto no es necesariamente útil, deseable o apropiado ni económica ni industrialmente el uso de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que contengan genes de otros géneros o especies, o que se produzcan usando métodos de ADN recombinante. De hecho las cepas obtenidas mediante estrategias de ADN recombinante no son útiles industrialmente mientras haya barreras sociales, ambientales, políticas o de otro tipo para el uso de tales cepas.

25 El uso de técnicas de ADN recombinante disminuye las oportunidades y la conveniencia del uso de levaduras en alimentación humana, etc., mientras que las cepas no recombinantes se podrían usar de forma ventajosa en alimentación humana etc. La capacidad para usar la levadura no recombinante de modo simultáneo para la producción de etanol y alimentos para el ser humano proporciona oportunidades para mejorar la rentabilidad de los procesos basados en levaduras. Por ejemplo es posible el uso de levaduras no recombinantes para transformar la
30 xilosa en etanol y biomasa de levadura. El etanol se puede usar como combustible y en otras aplicaciones mientras que la levadura producida se puede usar en otras aplicaciones valiosas tales como la producción de extractos y otros productos secundarios.

Los autores de la invención han descubierto que cuando las cepas de *Saccharomyces* no recombinante de tipo silvestre se incuban en un medio que comprende xilosa como única fuente de carbono, se detecta un crecimiento muy lento en la xilosa. Esto contradice a la técnica anterior, que claramente indica que *Saccharomyces* no puede
35 crecer en xilosa. Los autores de la invención creen que el crecimiento de *Saccharomyces* en xilosa es tan lento que no se ha detectado previamente. Como se describe en el presente documento, los autores de la invención han descubierto que, cuando se inoculaba un medio mineral mínimo sólido, que contiene xilosa como única fuente de carbono, con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de tipo silvestre, se detectaba crecimiento de las colonias por
40 examen microscópico después de una incubación durante 2 meses a 30 °C. Aunque el crecimiento detectado permite usar la aplicación de estrategias no recombinantes para obtener levaduras con tasas de crecimiento aumentadas, la muy lenta tasa de crecimiento observada no tiene utilidad industrial.

45 Los autores de la invención han ampliado su hallazgo de que *Saccharomyces* es capaz de un crecimiento muy lento en xilosa como única fuente de carbono para desarrollar cepas de *Saccharomyces* que sean capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono con tasas mucho más elevadas que las cepas de *Saccharomyces* en las que no se ha aplicado el método de la presente invención. Anteriormente al hallazgo de los autores de la invención, no se creía posible que la incubación de células de levadura de *Saccharomyces* en o sobre un medio que contenga
50 xilosa como única fuente de carbono daría como resultado alguna selección o enriquecimiento de las células de levadura capaces de crecer en xilosa ya que se creía que la levadura no crecería en el medio debido a que la xilosa no se veía como una fuente de carbono utilizable por *Saccharomyces*. Sin embargo, usando sus hallazgos y una combinación de estrategias y métodos de selección, tales como el cruzamiento de poblaciones de cepas de *Saccharomyces* genéticamente diversas, cepas adecuadas de *Saccharomyces cerevisiae*, los autores de la invención han descubierto que se pueden producir cepas de *Saccharomyces* que sean capaces de crecer en un
55 medio sólido, y/o en un medio líquido, que contenga xilosa como única fuente de carbono a tasas que sean más elevadas que las de las cepas de *Saccharomyces* a las que no se han aplicado los métodos de la presente invención. Además, los autores de la invención han descubierto que empleando métodos y estrategias de selección, tales como el cruzamiento de cepas de *Saccharomyces* genéticamente diversas, se pueden producir cepas de *Saccharomyces* que tengan una tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono que sea de al menos de una generación cada 48 horas y, en algunas realizaciones ventajosas, puede ser mayor de una generación cada 4 horas. Por tanto, usando métodos no recombinantes, los autores de la invención han podido generar cepas de *Saccharomyces* que son capaces de crecer en medios líquidos o sólidos que contengan xilosa como única fuente de carbono a tasas industrialmente útiles.

65 La presente memoria descriptiva desvela una cepa de *Saccharomyces* producida por el método de la invención.

ES 2 373 397 T3

La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* que es capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, en la que la cepa produce:

- 5 (i) un incremento 5 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1; y
- 10 (ii) al menos 10 mg de peso seco de biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2,

y en la que la cepa se produce mediante el método descrito en el presente documento.

15 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* que es capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, en la que:

- 20 (i) la cepa produce un incremento 10 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1; y
- (ii) la cepa produce al menos 50 mg de peso seco de biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2; y
- 25 (iii) se detectan al menos 0,1 g/l de etanol en las condiciones que se especifican en el Ensayo T3; y
- (iv) se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30 °C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T4; y
- 30 (v) se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30 °C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T5; y

en la que la cepa se produce mediante el método descrito en el presente documento.

35 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* que es capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, en la que:

- 40 (i) la cepa produce al menos un incremento 5 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el ensayo T1; y
- (ii) la cepa produce al menos 40 mg de peso seco de biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2; y
- 45 (iii) se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30 °C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T4; y
- (iv) se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30 °C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T5; y
- 50 (v) la cepa produce al menos un incremento 5 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el ensayo T7; y
- (vi) se detectan al menos 0,04 g/l de etanol en las condiciones que se especifican en el Ensayo T8;

55 y en la que la cepa se produce mediante el método descrito en el presente documento.

La presente memoria descriptiva desvela que la cepa produce al menos 0,2 gramos de etanol por litro en un período de 4 meses en las condiciones que se especifican en el ensayo T9,

60 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* que es capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, en el que la capacidad de la cepa para utilizar la xilosa como única fuente de carbono se obtiene por métodos no recombinantes.

65 La tasa de crecimiento de la cepa puede ser cualquier tasa que sea al menos una generación cada 48 horas. La tasa de crecimiento puede ser al menos una generación cada 36 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor de una

- 5 generación cada 24 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor que una generación cada 12 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor que una generación cada 10 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor que una generación cada 8 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor que una generación cada 6 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor que una generación cada 4 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor que una generación cada 2 horas. La tasa de crecimiento puede ser mayor que una generación cada 80 minutos.
- 10 La presente memoria descriptiva desvela una cepa capaz de crecer usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento a una tasa que sea sustancialmente la misma que la tasa de crecimiento de la cepa usando la glucosa como única fuente de carbono para su crecimiento.
- 15 La presente memoria descriptiva desvela que la cepa tiene una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas en un medio mínimo mineral de xilosa.
- 20 La presente memoria descriptiva desvela que la cepa produce un incremento 2 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones especificadas en el Ensayo T1. Generalmente, la cepa produce un incremento un incremento 5 veces superior en cuando crece en las condiciones especificadas en el Ensayo T1. De forma apropiada, la cepa produce un incremento al menos 10 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones especificadas en el Ensayo T1.
- 25 La presente memoria descriptiva desvela que la cepa produce al menos 0,01 g de peso seco de biomasa por 50 ml de cultivo cuando crece en las condiciones especificadas en el Ensayo T2.
- 30 La presente memoria descriptiva desvela que:
- (i) la cepa expresa una enzima no recombinante que tiene al menos 1 unidad de actividad xilosa reductasa en las condiciones especificadas en el Ensayo T4;
 - (ii) la cepa expresa una enzima no recombinante que tiene al menos 1 unidad de actividad xilitol deshidrogenasa en las condiciones especificadas en el Ensayo T5;
 - (iii) la cepa expresa una enzima no recombinante que tiene al menos una unidad de actividad xilosa reductasa en las condiciones especificadas en el Ensayo T4, una enzima no recombinante que tiene al menos una unidad de actividad xilitol deshidrogenada en las condiciones especificadas en el Ensayo T5.
- 35 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* que es capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, y que es capaz de expresar una enzima no recombinante que tenga una actividad seleccionada del grupo que consiste en xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, en el que la actividad xilosa reductasa es de al menos 1 unidad cuando se determina mediante el Ensayo T4, y la actividad xilitol deshidrogenasa es al menos 1 unidad cuando se determina en las condiciones especificadas en el Ensayo T5.
- 40 La cepa puede ser capaz de expresar una enzima no recombinante que tenga actividad xilosa reductasa y una enzima no recombinante que tenga actividad xilitol deshidrogenasa. La presente memoria descriptiva desvela una cepa capaz de expresar una enzima no recombinante que tenga actividad xilulosa quinasa además de una o más enzimas no recombinantes que tengan una actividad seleccionada del grupo que consiste en xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa. Generalmente, la actividad xilulosa quinasa es de al menos 5 unidades cuando se determina mediante el Ensayo T6.
- 45 Generalmente, la cepa del noveno aspecto tiene una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono.
- 50 Generalmente, la cepa produce un incremento al menos 2 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1. Generalmente, la cepa produce un incremento al menos 5 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1. Más generalmente, la cepa produce un incremento al menos 5 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1.
- 55 La cepa puede producir al menos 10 mg de peso seco de biomasa en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2. La cepa puede producir al menos 30 mg de peso seco de biomasa en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2. La cepa puede producir al menos 40 mg de peso seco de biomasa en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2. Generalmente, la cepa produce al menos 50 mg de peso seco de biomasa en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2.
- 60 La cepa puede producir al menos 0,01 g de peso seco de biomasa por 50 ml de cultivo cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2.
- 65

- 5 La cepa de *Saccharomyces* puede ser capaz de usar adicionalmente el xilitol como única fuente de carbono para su crecimiento. Generalmente, la capacidad de la cepa para utilizar el xilitol como única fuente de carbono se obtiene mediante métodos no recombinantes. Generalmente, la cepa produce un incremento al menos 5 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones que se especifican en el Ensayo T7.
- 10 La cepa de *Saccharomyces* puede ser capaz de crecer de forma aerobia o anaerobia usando la xilosa como única fuente de carbono. Generalmente, el crecimiento es un crecimiento aerobio. Sin embargo, la cepa de *Saccharomyces* también puede crecer de forma anaerobia o microaerófila usando la xilosa como única fuente de carbono.
- 15 La cepa de *Saccharomyces* puede ser capaz de crecer en glucosa en condiciones anaerobias.
- La cepa de *Saccharomyces* puede además ser capaz de utilizar la xilosa para producir uno o más compuestos basados en carbono. Los ejemplos de compuestos basados en carbono adecuados incluyen alcoholes, xilitol, ácidos orgánicos, tales como el ácido acético, glicerol, dióxido de carbono, u otros componentes de la levadura, metabolitos y productos secundarios que incluyen extractos de levadura, proteínas, péptidos, aminoácidos, ARN, nucleótidos, glucanos, etc. Generalmente, el alcohol es etanol.
- 20 La cepa puede producir etanol cuando crece en xilosa. La cepa puede usar la xilosa para producir etanol sin crecer en la xilosa. La cepa puede producir etanol a partir de la xilosa. Generalmente, la cepa fermenta la xilosa para producir etanol.
- 25 La cepa puede producir etanol en una concentración de al menos 0,1 g/l en las condiciones que se especifican en el Ensayo T3.
- La cepa puede producir etanol en una concentración de al menos 0,4 g/l en las condiciones que se especifican en el Ensayo T8. La cepa puede producir al menos 0,2 g de etanol por litro en un período de 4 meses en las condiciones que se especifican en el Ensayo T9.
- 30 La cepa puede producir al menos 0,5 g de etanol por litro cuando se inocula con una densidad celular de al menos 5×10^8 células por ml en un medio mineral mínimo que contenga xilosa. El medio mineral mínimo que contiene xilosa puede contener glucosa. Generalmente, la cepa produce 0,5 g/l de etanol en 5 horas tras la inoculación del medio.
- 35 Generalmente, la cepa fermenta la xilosa para producir al menos 0,05 gramos de etanol por litro de cultivo en las condiciones que se especifican en el Ensayo T3.
- 40 La cepa puede utilizar la xilosa como única fuente de carbono para crecer en un medio sólido y/o en un medio líquido. Generalmente, la cepa puede crecer en un medio líquido que contenga xilosa como única fuente de carbono. El medio líquido puede ser un medio mineral líquido que contenga xilosa como única fuente de carbono.
- 45 La cepa de *Saccharomyces* puede ser una cepa de cualquiera de las especies del género *Saccharomyces*. Los ejemplos de especies adecuadas de levadura incluyen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. bayanus*. Generalmente la especie es *Saccharomyces cerevisiae*. Generalmente la cepa se podrá cruzar con *Saccharomyces* de la misma especie. Generalmente la cepa se podrá cruzar con *Saccharomyces cerevisiae*. Generalmente, la cepa es *Saccharomyces cerevisiae*.
- La cepa de *Saccharomyces* puede ser recombinante.
- 50 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* no recombinante que produce un incremento al menos 2 veces superior en biomasa cuando crece en las condiciones especificadas en el Ensayo T1.
- La presente memoria descriptiva desvela que el incremento en biomasa es al menos 5 veces superior, generalmente al menos 10 veces superior.
- 55 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* no recombinante que presenta las siguientes características:
- 60 (a) La biomasa de la cepa aumenta al menos 5 veces en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1;
- (b) Se producen al menos 10mg de peso seco de biomasa en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2.
- 65 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* no recombinante que presenta las siguientes características:

(a) La biomasa de la cepa aumenta al menos 10 veces en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1;

5 (b) Se producen al menos 50 mg de peso seco de biomasa en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2;

(c) Se detecta una concentración de al menos 0,1 g/l de etanol en las condiciones que se especifican en el Ensayo T3;

10 (d) Se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30°C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T4; y

15 (e) Se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30°C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T5.

La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* no recombinante que presenta las siguientes características:

20 (a) La biomasa de la cepa aumenta al menos 5 veces en las condiciones que se especifican en el Ensayo T1;

(b) Se producen al menos 40 mg de peso seco de biomasa en las condiciones que se especifican en el Ensayo T2;

25 (c) La biomasa de la cepa aumenta al menos 5 veces en las condiciones que se especifican en el Ensayo T7;

30 (d) Se detecta una concentración de al menos 0,04 g/l de etanol en las condiciones que se especifican en el Ensayo T8;

(e) Se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30°C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T4; y

35 (f) Se reduce o se oxida al menos 1 nanomol de NAD(P)H por minuto y por mg de extracto de proteína a 30°C en las condiciones que se especifican en el Ensayo T5.

40 Son ejemplos de cepas adecuadas de *Saccharomyces* que pueden crecer con una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas, usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, las depositadas según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes en los Laboratorios Analíticos del Gobierno de Australia, 1 Suakin Street, Pymble, NSW 2073, Australia, con los n^{os} de acceso de depósito NM04/41257, NM04/41258, NM05/45177 (ISO 10) y NM05/45178 (ISO 7). Los números de acceso de depósito NM04/41257 y NM04/41258 se depositaron el 12 de Mayo del 2004. Los números de acceso de depósito NM05/45177 y NM05/45178 se depositaron el 16 de Mayo del 2005.

45 La cepa de *Saccharomyces* se puede obtener por cualquier procedimiento mencionado en el presente documento en el que la capacidad para utilizar la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento se obtenga por métodos no recombinantes. Los métodos que se pueden emplear para obtener la cepa incluyen combinaciones de, selección natural, procedimientos de cruzamiento, mutagénesis, u otros métodos genéticos denominados clásicos conocidos por los expertos en la materia y analizados y mencionados, por ejemplo, en Attfield y Bell (2003) "Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts" en, Topics in Current Genetics, Vol 2, en Functional Genetics of Industrial Yeasts (J.H. de Winde, ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg o en combinaciones de los mismos.

50 La capacidad para crecer con una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono se obtiene generalmente mediante el cruce entre cepas de *Saccharomyces* y identificación o selección de la tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono.

60 Por ejemplo, las cepas se pueden obtener realizando cruzamientos poco frecuentes o dirigidos o masivos entre cepas de *Saccharomyces* sexualmente compatibles, seguido de una selección de cepas capaces de utilizar la xilosa como única fuente de carbono. Las cepas se pueden obtener a partir de uno o más aislados de *Saccharomyces* de origen natural, aislados mutados espontáneamente, o se pueden obtener por exposición de una o más cepas de *Saccharomyces* a un agente mutagénico y uso posterior de estrategias de cruzamiento y selección para la identificación o selección de una cepa mutante que pueda utilizar la xilosa como única fuente de carbono. La cepa obtenida se puede seleccionar mediante cualquiera de los métodos de selección mencionados en el presente documento.

65

La presente memoria descriptiva desvela un derivado de una cepa como se describe en el presente documento.

Los métodos para la producción de derivados de cepas de levadura se conocen bien en la técnica e incluyen cruces con otras cepas de levadura, fusiones celulares, mutagénesis y/o métodos recombinantes.

5 En un aspecto, la presente memoria descriptiva desvela el uso de una cepa de *Saccharomyces* como se describe en el presente documento, en la producción de biomasa de levadura. La biomasa de levadura se puede usar, por ejemplo, en la industria panificadora, para productos de biomasa.

10 En otro aspecto, la presente memoria descriptiva desvela el uso de una cepa de *Saccharomyces* como se describe en el presente documento, para la producción de etanol a partir de xilosa.

15 En un aspecto, la presente memoria descriptiva desvela un procedimiento para la producción de etanol consistente en la incubación de una cepa de *Saccharomyces* como se describe en el presente documento, en un medio que contenga xilosa, en condiciones que permitan a la cepa fermentar la xilosa para producir etanol.

20 En un aspecto, la presente memoria descriptiva desvela un procedimiento para convertir xilosa en biomasa de levadura, que consiste en el cultivo de una cepa de *Saccharomyces* como se describe en el presente documento, en un medio que contenga xilosa en condiciones que permitan a la cepa crecer usando la xilosa como fuente de carbono para su crecimiento.

25 En otro aspecto, la presente memoria descriptiva desvela un procedimiento para producir biomasa de levadura que consiste en el crecimiento de una cepa de *Saccharomyces* en o sobre un medio que contenga xilosa, en el que al menos se obtenga una parte de la biomasa de levadura producida usando la xilosa como fuente de carbono para su crecimiento.

30 En un aspecto, la presente memoria descriptiva desvela un procedimiento para producir un compuesto a partir de una cepa de *Saccharomyces*, que consiste en el cultivo de una cepa de *Saccharomyces* en o sobre un medio que contenga xilosa en condiciones que permitan la producción del compuesto, en el que el compuesto se produce a partir de la cepa usando la xilosa como fuente de carbono.

En una realización, el compuesto se produce a partir de la cepa durante su crecimiento usando la xilosa como fuente de carbono.

35 En una realización, el procedimiento consta de la etapa adicional de la recuperación del producto.

40 El compuesto puede ser cualquier compuesto que pueda producirse a partir de una cepa de *Saccharomyces*. Los ejemplos de compuestos adecuados incluyen etanol, CO₂, enzimas, enzimas recombinantes, proteínas recombinantes, productos secundarios de la levadura, vitaminas, nucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, lípidos, proteínas de levadura, xilitol.

45 Los expertos en la materia apreciarán que el crecimiento de las células de levadura produce biomasa, y por lo tanto cualquier procedimiento que de como resultado un crecimiento dará como resultado la producción de biomasa. Por tanto, por ejemplo, la producción de etanol debido al crecimiento en un medio que contenga xilosa producirá además biomasa. En una realización, los compuestos están contenidos dentro de las células de levadura en la biomasa y los compuestos se pueden recuperar de las células de levadura usando métodos bien conocidos en la técnica para la extracción de compuestos de las células de levadura.

50 La presente memoria descriptiva desvela un compuesto producido por el método descrito en el presente documento.

Breve Descripción de las Figuras

55 La Figura 1 muestra un gráfico del tiempo medio de duplicación de una población de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a lo largo del tiempo tras la aplicación del método de la invención.

Descripción Detallada de la Invención

60 La realización práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, microbiología convencional y genética clásica. Los operarios expertos conocen dichas técnicas y se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sherman et. al. "Methods en Yeast Genetics" (1981) Cold Spring Harbor Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; y la Patente Europea número EP 0 511 108 B.

65 También se debe comprender que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no tiene por objeto limitar el ámbito de la presente invención que solo limitarán las reivindicaciones adjuntas. Debe señalarse que, tal y como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "la" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el

contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células. A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar para la realización práctica o para el ensayo de la presente invención, a continuación se describen los materiales y métodos preferidos.

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se citan con el propósito de describir y revelar los protocolos y reactivos que se presentan en las publicaciones y que se podrían usar junto con la invención. Nada en el presente documento se debe interpretar como una admisión de que la invención no da derecho a antedatar tal divulgación en virtud de la invención anterior.

La xilosa es un azúcar asequible, puede obtenerse de una fuente renovable y está disponible en grandes cantidades. La xilosa puede representar una parte significativa de la biomasa vegetal hemicelulósica. La biomasa vegetal incluye residuos agrícolas, desechos de papel, astillas de madera y similares, y es renovable y disponible a bajo coste en grandes cantidades. La xilosa se presenta principalmente en la biomasa vegetal hemicelulósica en forma de polímeros conocidos como xilano y hemicelulosa. Los polímeros de xilosa se pueden descomponer fácilmente en azúcares monoméricos tanto por medios químicos tales como hidrólisis ácida, o por medios enzimáticos usando enzimas tales como xilanasas. Por ejemplo, en la fabricación de papel, la xilosa es uno de los principales azúcares en el flujo de residuos, donde contribuye a la demanda biológica de oxígeno (DBO) y de ese modo dificulta la eliminación medioambiental de las aguas residuales. Por cada kilo de papel producido a partir de madera, generalmente se producen 100 gramos de azúcar, de los cuales 35 gramos son xilosa. Debido a su abundancia, la xilosa representa una importante fuente potencial de carbono para la producción de biomasa de levadura y productos secundarios del metabolismo de la levadura tales como el etanol.

La presente memoria descriptiva desvela una cepa de *Saccharomyces* que puede crecer con una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono. Los autores de la invención han descubierto que se pueden obtener cepas de *Saccharomyces* que pueden crecer relativamente rápido usando la xilosa como única fuente de carbono sin la necesidad de usar tecnología de ADN recombinante. Este es un resultado inesperado ya que anteriormente se creía que las cepas de *Saccharomyces* no podían crecer sobre xilosa como única fuente de carbono. Hasta la presente invención, las cepas de *Saccharomyces* capaces de crecer con tasas de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono sólo se habían obtenido introduciendo, en las cepas de *Saccharomyces*, genes de utilización de xilosa clonados procedentes de otros organismos que son capaces de crecer en xilosa. De modo alternativo, se han generado combinaciones de promotores de genes clonados de *Saccharomyces* y secuencias de ADN clonadas de *Saccharomyces* que no son de origen natural, usando métodos recombinantes y se han introducido en las cepas de *Saccharomyces*. Por lo tanto, antes de la presente invención, no se habían podido obtener cepas de *Saccharomyces* capaces de utilizar la xilosa como única fuente de carbono a menos que, o bien los genes para la utilización de la xilosa procedentes de otros organismos capaces de crecer en xilosa, se hubieran clonado e introducido en la cepa de *Saccharomyces*, o bien los promotores de genes fuertes de *Saccharomyces* se hubieran unido operativamente a otras secuencias de ADN de *Saccharomyces* e introducido en la cepa de *Saccharomyces* usando métodos de ADN recombinante.

Antes de la presente invención, las levaduras no recombinantes del género *Saccharomyces* podían crecer con una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas usando xilosa como única fuente de carbono. La Patente de Estados Unidos Nº 4.511.656 desvela que la cepa de levadura de la compañía ATCC Nº 20618 es una levadura no recombinante mutante capaz de producir etanol cuando se incubaba en un medio que contenga xilosa. Sin embargo, la ATCC 20618 no es del género *Saccharomyces*. La morfología de las colonias producidas por la ATCC Nº 20618 no es coherente con aquellas producidas por *Saccharomyces*. La ATCC Nº 20618 no esporula, no se cruza con cepas convencionales de *Saccharomyces cerevisiae*, y la secuenciación de las regiones ITS y la región intergénica de la histona H3-H4 de la ATCC Nº 20618 pone de manifiesto que no es del género *Saccharomyces*, pero está estrechamente relacionada con *Candida tropicalis*. Por consiguiente, la ATCC 20618 se aleja filogenéticamente de *Saccharomyces* tal como define Kurtzman (2003) FEMS Yeast Research 4:233-245 y como se define en el presente documento. Se conoce bien la utilización de la xilosa por *Candida tropicalis*. Además, sólo se demostró que los mutantes descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 4.511.656 producen etanol cuando se les proporcionan nutrientes para su crecimiento tales como extracto de levadura, extracto de malta y peptona en el medio de crecimiento. Estos nutrientes de crecimiento proporcionan fuentes de carbono fermentables alternativas a la xilosa. Por tanto, la Patente de Estados Unidos Nº 4.511.656 no desvela cepas de *Saccharomyces* que sean capaces de crecer o fermentar en xilosa como única fuente de carbono.

Además en la Patente de Estados Unidos Nº 4.511.656 se enseña que de las levaduras capaces de producir etanol se seleccionan las que forman colonias en xilosa pero no en xilitol. Sin el deseo de limitarse a la teoría, al contrario de las enseñanzas de la Patente de Estados Unidos Nº 4.511.656, los autores de la invención piensan que se puede esperar que el metabolismo del xilitol, que es un producto intermedio en la utilización de la xilosa, presente ventajas en el crecimiento en xilosa y en la producción de etanol a partir de la xilosa.

Al contrario de la enseñanza de la técnica anterior, los autores de la invención han descubierto que las cepas de

Saccharomyces no sólo son capaces crecer lentamente en xilosa como única fuente de carbono, sino que la tasa de crecimiento de las cepas de *Saccharomyces* usando la xilosa como única fuente de carbono se puede aumentar sin introducir genes clonados de utilización de xilosa.

- 5 La presente memoria descriptiva desvela una cepa aislada de *Saccharomyces* que es capaz de crecer con una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono. Tal y como se usa en el presente documento, una cepa de *Saccharomyces* es una cepa del género *Saccharomyces* tal y como se define en Kurtzman (2003) FEMS Yeast Research vol. 4, págs. 233-245.
- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión "capaz de crecer con una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento" significa que la cepa es capaz de usar la xilosa como única fuente de carbono para generar energía y la síntesis de las moléculas que son necesarias para el crecimiento de la cepa, para alcanzar una tasa de crecimiento de una generación cada 48 horas. El término "una generación" significará claramente para los expertos en la materia un ciclo de la división celular.
- 15 Preferentemente, la cepa será capaz de crecer en medios sólidos o líquidos en los que la xilosa sea la única fuente de carbono. Los expertos en la materia apreciarán que una cepa que sea capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono será capaz de crecer en medios sólidos y/o líquidos minerales mínimos, en los que la xilosa sea la única fuente de carbono. Un ejemplo de un medio líquido adecuado es la base nitrogenada de levadura sin aminoácidos disponible en el mercado en los Laboratorios DIFCO, que contiene todas las sales inorgánicas esenciales y las vitaminas necesarias para el cultivo de levaduras, excepto una fuente de hidratos de carbono o aminoácidos, complementada con xilosa entre el 0,01% y el 50%, generalmente xilosa al 1% y 10%, de forma apropiada xilosa al 5%. Generalmente, el medio sólido es un medio líquido que se ha solidificado por adición de un agente gelificante tal como agar. Los expertos en la materia también apreciarán que una cepa que sea capaz de crecer usando la xilosa como única fuente de carbono también pueda
- 20 crecer en otros muchos azúcares. La capacidad de la cepa para usar la xilosa como única fuente de carbono se obtiene por métodos no recombinantes. Como se usa en el presente documento, la expresión "métodos no recombinantes" se refiere a cualquier método que no utilice tecnología de ADN recombinante para producir la capacidad para utilizar xilosa en la cepa de *Saccharomyces*. En otras palabras, los genes que otorgan a la cepa la capacidad de utilizar xilosa para su crecimiento no se han introducido en la cepa usando métodos recombinantes.
- 25 Como se usa en el presente documento, un "método recombinante" es un método en el que uno o más genes se introducen en un organismo usando técnicas de ADN recombinantes. Como se usa en el presente documento, las técnicas de ADN recombinantes se refieren a técnicas en las que la información genética se manipula *in vitro*, como cuando los genes se aíslan y se clonan de un organismo. Por tanto, los métodos no recombinantes son métodos que no implican la manipulación de la información genética *in vitro*. Una cepa no recombinante es una cepa en la que no
- 30 se ha introducido el ácido nucleico recombinante.

Los métodos no recombinantes pueden incluir, por ejemplo, mutagénesis, cruzamiento clásico, citoducción, fusión celular tal como la fusión del protoplasto, y combinaciones de los mismos. El método no recombinante puede comprender cultivar una población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* en condiciones que permitan combinar el ADN de las células de levadura *in vivo*, e identificar o seleccionar células de levadura que tengan una mayor tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono, generalmente incubando una población genéticamente diversa de células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante un tiempo suficiente para seleccionar las células de levadura que tengan una mayor tasa de crecimiento usando la xilosa como

40 única fuente de carbono.

Los expertos en la materia entenderán que la información genética que otorga a la cepa de *Saccharomyces* la capacidad de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono se obtiene del género *Saccharomyces*. En otras palabras, toda la información genética necesaria para el crecimiento a una tasa de al menos una generación cada 48 horas se obtiene de la reserva genética del género *Saccharomyces*. Generalmente, la información genética que otorga a la cepa de *Saccharomyces* la capacidad de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas utilizando la xilosa como una única fuente de carbono para su crecimiento se obtiene de una población genéticamente diversa de cepas de *Saccharomyces* no recombinante. Como se ha analizado anteriormente, antes de la presente invención, se pensó que la reserva genética del género *Saccharomyces* no contenía la información genética para otorgar la capacidad para utilizar xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.

50

55

La presente memoria descriptiva desvela cepas aisladas de *Saccharomyces* que tienen la capacidad de crecer en xilosa como única fuente de carbono a una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas y que son capaces de expresar enzimas no recombinantes que tengan una actividad seleccionada del grupo que consiste en xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa. La enzima tiene una actividad de al menos una unidad como se determina en el Ensayo T4 para la xilosa reductasa y en el ensayo T5 para la xilitol deshidrogenasa. En el presente documento se definen los Ensayos T4 y T5. Generalmente, la actividad xilosa reductasa es al menos de 1,5 unidades, de forma apropiada al menos de 3 unidades. Generalmente, la actividad xilitol deshidrogenasa es al menos de 5 unidades, de forma apropiada al menos de 8 unidades.

60

65

La presente memoria desvela un método para producir una cepa de *Saccharomyces* capaz de crecer con una tasa de crecimiento deseada usando xilosa como una única fuente de carbono. La "tasa de crecimiento deseada" puede ser cualquier tasa de crecimiento que sea mayor que la tasa de crecimiento de las células de levadura de *Saccharomyces* antes de aplicar el método de la invención. La tasa de crecimiento deseada será mayor que la tasa de crecimiento de la cepa NL67 de *Saccharomyces cerevisiae* sobre xilosa como una única fuente de carbono. La tasa de crecimiento deseada puede ser de al menos una generación cada 48 horas, de forma apropiada más de una generación cada 24 horas, de forma apropiada más de una generación por 12 horas, generalmente más de una generación cada 10 horas, más generalmente mayor que una generación cada 8 horas y puede ser tan alta como la tasa de crecimiento de *Saccharomyces* en glucosa, que es aproximadamente una generación cada 80 minutos.

El método consiste en proporcionar una población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces*. Como se usa en la presente memoria, la expresión "células de levadura no recombinantes genéticamente diversas" se refiere al menos a dos células de levadura no recombinante que tengan distintos genotipos. Las células de levadura no recombinante genéticamente diversas pueden ser una mezcla de células de levadura de diferentes cepas de *Saccharomyces* que se obtienen de forma natural, del vino, de la destilación y fermentación de la cerveza, de aplicaciones de panadería, o de cualquier otra fuente de *Saccharomyces*. La población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces* pueden proceder de una sola cepa que esporula para obtener una descendencia genéticamente diversa. La población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces* puede incluir una o más células de levadura de cepas de *Saccharomyces* que se hayan expuesto a un agente mutagénico físico o químico, tal como, por ejemplo, luz ultravioleta, rayos X o rayos Gamma, o etilmetanosulfonato, nitrosoguanidina, mitomicina C, bleomicina, o cualquier otro agente que produzca modificaciones en las secuencias de las bases de ADN. Por tanto, las células de levadura no recombinante genéticamente diversas incluyen, dentro de su alcance, células de cepas de levadura que se hayan generado por mutagénesis. Los expertos en la materia conocen los métodos de mutagénesis de levadura, y en particular, la mutagénesis de *Saccharomyces cerevisiae*, y se describen, por ejemplo, en Sherman et al. "Methods in Yeast Genetics" (1981) Cold Spring Harbor Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York. La población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces* también puede incluir células de levadura con mutaciones de origen natural que se producen espontáneamente. Toda la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces* puede ser de la misma especie, o puede ser de especies diferentes de *Saccharomyces*. Generalmente, las especies diferentes pueden cruzarse entre ellas. Por ejemplo, la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante puede comprender diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, o cualquier otra especie de *Saccharomyces*, obtenidas a partir de cualquiera de las fuentes mencionadas anteriormente. Los ejemplos de especies de *Saccharomyces* adecuadas incluyen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. bayanus*. Generalmente, la población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* es la misma especie. Generalmente, la especie es *Saccharomyces cerevisiae*.

Los ejemplos de levaduras que se podrían usar para proporcionar inóculos de partida para poblaciones genéticamente diversas de células de levadura no recombinante incluyen cepas de *Saccharomyces* disponibles procedentes de colecciones de cultivo bien conocidas, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), por ejemplo la ATCC 4111, ATCC 26603, ATCC 38559, la Colección Nacional de Cultivos de Levaduras (NCYC, por sus siglas en inglés) por ejemplo NCYC 995 y NCYC 996 de *S. cerevisiae*; la Oficina Central de Cultivos de Hongos (CRBS, por sus siglas en alemán), por ejemplo CBS 745,95, CBS 755,95 de *S. cerevisiae*, o aislados de levaduras disponibles en el mercado que comercializan algunas compañías para su uso en formulaciones tradicionales, tales como fabricación de pan, elaboración de cerveza, vino, destilería, etc.

La población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces* se cultiva en condiciones que permitan la combinación del ADN entre las células de levadura. La combinación de ADN entre las células de levadura puede realizarse mediante cualquier método adecuado para combinar ADN a partir de al menos dos células de levadura, siempre que el método no sea un método recombinante. Los ejemplos de métodos adecuados para combinar el ADN de las células de levadura incluyen cruzamiento y citoducción. Como se usa en el presente documento, el término "cruzamiento" se refiere al proceso de intercambio y recombinación del ADN entre al menos dos células de levadura, incluyendo por los métodos clásicos de cruzamiento genético, cruzamiento dirigido, cruzamiento masivo, cruzamientos excepcionales, fusión celular, etc. Por ejemplo, para generar híbridos intraespecíficos o interespecíficos se pueden usar cruces genéticos clásicos.

En una realización, las células de levadura se cultivan en condiciones que permitan el cruce entre las células de levadura. Generalmente, las células de levadura se cultivan en condiciones que permitan el cruce por esporulación de las células de levadura y después de esto cruzar la levadura esporulada. Por ejemplo, las células de levadura se pueden cruzar por:

(a) esporulamiento de las células de levadura;

(b) germinación de las células de levadura esporuladas;

(c) hibridación de tipos de cruzamientos compatibles de las células de levadura esporuladas.

Generalmente, las células de levadura se cruzan por:

- 5 (a) agrupación de la población de células genéticamente diversas de células de levadura no recombinante;
- (b) esporulación de las células agrupadas y germinación de las esporas para producir células haploides;
- 10 (c) hibridación de tipos de apareamiento compatibles de las células haploides para producir células híbridas de levadura.

En la técnica se conocen métodos de esporulación, para la obtención de células haploides e hibridación de las células haploides para producir células de levadura híbridas y se describen, por ejemplo, en el Capítulo 7 de "Sporulation and Hybridisation of Yeast" by R.R. Fowell, en "The Yeasts" Vol. 1 editado por A.H. Rose y J.S. Harrison, 1969, Academic Press; EP 0 511 108 B. Generalmente, el cruce es un cruzamiento masivo. El cruzamiento masivo implica el cultivo de al menos dos y generalmente millones de diferentes células de levadura juntas de manera que se permita que el cruzamiento suceda entre tipos de cruzamiento compatibles. Los métodos de cruzamiento masivo se describen, por ejemplo, en Higgins et al. (2001), Applied and Environmental Microbiology vol. 67, págs. 4346-4348; Lindgren (1943), Journal of Bacteriology vol. 46 págs. 405-419,

- 20 En otra realización, la levadura se cultiva en condiciones que permitan la fusión celular. Los métodos usando técnicas de fusión celular para la generación de híbridos intraespecíficos o interespecíficos se describen, por ejemplo, en Morgan (1983) Experientia suplem. 46:155-166; Spencer et al. (1990) en Yeast Technology, Spencer JFT y Spencer DM (eds.), Springer Verlag Nueva York. Los métodos de citoducción se describen, por ejemplo, en Inge-Vechtomov et al. (1986) Genetika 22:2625-2636; Johnston (1990) en, Yeast Technology, Spencer JFT y Spencer DM (Eds.), Springer Verlag Nueva York; Polaina et al. (1993) Current Genetics 24: 369-372,

Las células de levadura se identifican o se seleccionan para determinar células de levadura que tengan una mayor tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento. Las células de levadura se identifican o se seleccionan para enriquecer o reconocer células de levadura que tengan una mayor tasa de crecimiento usando xilosa como única fuente de carbono. Las células de levadura se identifican o se seleccionan generalmente por incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa. Las células de levadura se identifican o se seleccionan entre aquellas células de levadura que tengan una mayor capacidad para crecer usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento. La mayor capacidad generalmente será un aumento en la tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono para alcanzar la tasa de crecimiento deseada. Un aumento de la tasa de crecimiento es un aumento de la tasa de crecimiento de la célula de levadura con relación a la tasa de crecimiento de las células antes del cultivo de las células de levadura en condiciones que permitan la combinación del ADN entre las células de levadura. En una realización, las células de levadura se seleccionan. Los términos "seleccionado" o "seleccionando" se refieren a un proceso en el que las células de levadura que tengan una mayor capacidad para crecer usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento lleguen a enriquecerse dentro de la población. Las células de levadura se pueden seleccionar por incubación de las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante un tiempo suficiente para permitir, a las células de levadura capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono, crecer usando la xilosa como única fuente de carbono, y después de esto se recogen las células de levadura que crecen. Los autores de la invención han descubierto que incubando células de levadura durante el tiempo suficiente que permita un crecimiento incluso más lento de la levadura para crecer usando la xilosa como fuente de carbono, y después de esto entonces recoger las células de levadura que crecen, incluyendo el crecimiento lento de las células de levadura, el crecimiento más rápido de las células de levadura representará una mayor proporción de células de levadura recogidas y después de esto se enriquecen en las células de levadura recogidas, pero la diversidad genética de la población de células de levadura se mantiene sustancialmente al incluir también células de levadura de crecimiento lento. Por ejemplo, al sembrar en placas células de levadura cruzadas en un medio mínimo sólido que contenga xilosa como única fuente de carbono, las células capaces de utilizar más rápidamente la xilosa como única fuente de carbono generarían colonias más grandes, y como consecuencia, esas células se seleccionarían para ello y el o los genotipos deseados enriquecerían la población. Sin embargo, también al recoger las colonias más pequeñas, la diversidad genética de la población se mantendría sustancialmente para la siguiente repetición de las etapas (b) y (c). Por tanto incubando las células de levadura en un medio que contenga xilosa durante el tiempo suficiente para permitir que las células de levadura crezcan usando la xilosa como fuente de carbono, es posible no sólo seleccionar las células de levadura con mayor tasa de crecimiento en xilosa, sino también mantener la diversidad genética de la población durante ciclos repetidos de las etapas (b) y (c). Se puede aplicar una selección mejorada reduciendo el tiempo de incubación de las células de levadura en un medio que contenga xilosa de modo que sólo se seleccionen las células de levadura que crecen usando la xilosa como fuente de carbono dentro del periodo de tiempo preseleccionado. Las células de levadura de este tipo se pueden seleccionar incubando las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante el tiempo suficiente para permitir que las células de levadura con mayor tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono crezcan usando la xilosa como fuente de carbono y después de esto recoger las células de levadura que crecen. Usando esta estrategia, en las células de levadura se coloca una mayor presión selectiva para crecer a una tasa mayor, pero como es probable que no haya tiempo suficiente para que crezca una parte de las células de levadura de crecimiento lento,, se puede perder alguna

diversidad genética al repetir varias veces las etapas (b) y (c).

5 En otra realización, las células de levadura se identifican. Como se usa en el presente documento, el término "identificado" o "identificando" se refiere a un proceso en el que células de levadura que tienen una mayor capacidad de crecer usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento en la tasa de crecimiento deseada primero se identifican y posteriormente se aíslan. Las células de levadura se pueden identificar incubando las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa durante el tiempo suficiente para permitir que células de levadura con una tasa de crecimiento aumentada usando xilosa como única fuente de carbono crezcan usando xilosa como fuente de carbono y posteriormente se recogen las células de levadura que crecen más rápido usando xilosa como fuente de carbono. Por ejemplo, las células de levadura que tengan mayor capacidad para crecer usando xilosa como única fuente de carbono se pueden identificar en un medio rico que contiene xilosa como aquellas células que crecen más rápido y por lo tanto forman colonias más grandes que las células de levadura que no tienen una mayor capacidad de crecimiento usando xilosa como única fuente de carbono. Por lo tanto, las colonias más grandes que aparecen en la placase pueden aislar con preferencia sobre las colonias más pequeñas para así aislar las células de levadura que tienen una mayor capacidad para crecer usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento con la tasa de crecimiento deseada.

20 Como se ha analizado anteriormente, las células de levadura generalmente se identifican o se seleccionan incubando las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa. Un "medio que contenga xilosa" puede ser cualquier medio que contenga xilosa y que proporcione una ventaja selectiva a aquellas células de levadura que tengan una capacidad para crecer usando la xilosa como única fuente de carbono de modo más eficiente o más rápido que otras cepas. Como se usa en el presente documento, una "ventaja selectiva" es la capacidad de una célula o cepa de experimentar un mayor número de divisiones celulares que otras células o cepas debido a algún atributo, en este caso, la capacidad de crecer eficazmente usando la xilosa. Por lo tanto, un medio que proporcione una ventaja selectiva a una cepa permitirá a dicha cepa crecer más rápido en ese medio comparado con otras cepas a las que el medio no les proporcione una ventaja selectiva. Los expertos en la materia apreciarán que la levadura pueda crecer en una amplia diversidad de medios que incluyan al menos una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de sulfato, oligoelementos y vitaminas. El medio que contiene la xilosa puede ser un medio mínimo o un medio complejo. En una realización, el medio que contiene la xilosa es un medio mínimo. Un medio mínimo adecuado puede consistir, por ejemplo, en Fórmulas de Base Nitrogenada de Levaduras de DIFCO (véase el manual de Difco "Dehydrated culture media and reagents for microbiology" 10ª Edición, Laboratorios Difco 1984), junto con la xilosa en una concentración de entre 0,1% y 50%, entre 2% y 15% generalmente, 5% más generalmente. En otra realización, el medio que contiene xilosa puede ser un medio complejo. La concentración de xilosa en el medio complejo puede ser entre 0,1% y 50%, generalmente entre 2% y 30%, más generalmente entre 2% y 15%. En una realización, el medio complejo son medios de enriquecimiento completo. Un ejemplo de medio de enriquecimiento completo es un medio que comprende extracto de levadura entre 0,5 y 2%, preferiblemente 0,5%, peptona entre 0,5% y 2%, preferiblemente 1%, y xilosa en una concentración de entre 0,5% y 50%, generalmente 2% y 15%, más generalmente 5%. En otra realización, el medio complejo se selecciona del grupo que consiste en melazas, hidrolizados de almidón, hidrolizados de biomasa celulósica o hemicelulósica (tales como bagazo, rastrojo, pasta de madera, paja, residuos de papel, etc.), y combinaciones de los mismos, opcionalmente complementados con xilosa, y/o nutrientes. Los expertos en la materia apreciarán que el medio sólido puede ser cualquiera de los medios mencionados anteriormente generalmente complementados con agar entre 1% y 10%, más generalmente agar entre 1% y 5%, aún más generalmente agar entre 1% y 2%.

45 Las células de levadura se pueden identificar o seleccionar incubando las células en un medio sólido y/o líquido. En una realización, las células de levadura se identifican o se seleccionan incubando las células en un medio sólido. En otra realización, las células de levadura se identifican o se seleccionan incubando las células de levadura en un medio líquido. En una realización preferida, las células de levadura se identifican o se seleccionan incubando las células de levadura primero en un medio sólido, y posteriormente en un medio líquido. Por ejemplo, el método puede comprender:

- 55 (a) proporcionar una población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces*;
- (b) cultivar las células de levadura en condiciones que permitan el cruzamiento de las células de levadura;
- (c) identificar o seleccionar las células de levadura incubando las células de levadura en un medio que contenga xilosa;
- 60 (d) repetir las etapas (b) y (c) con las células de la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces* identificadas o seleccionadas, hasta que una o más células de levadura hayan adquirido la capacidad de crecer con la tasa de crecimiento deseada usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.
- 65 Generalmente, las etapas (b) y (c) se repiten hasta que una o más células de levadura hayan adquirido una tasa de crecimiento en xilosa suficiente para permitir a las células un cultivo conveniente en un medio líquido que contenga

- xilosa como única fuente de carbono. Por ejemplo, la tasa de crecimiento en un medio mineral mínimo sólido que contenga de 2% a 5% p/v de xilosa al que la cepa se puede transferir para crecer en el medio mineral mínimo líquido que contenga de 2% a 5% p/v de xilosa como única fuente de carbono se alcanzará generalmente siguiendo al menos 2 repeticiones de las etapas (b) y (c). Más generalmente al menos 5 repeticiones de las etapas (b) y (c).
- 5 Incluso más generalmente, al menos 10 repeticiones de las etapas (b) y (c). Los expertos en la materia apreciarán que el tiempo en que las células de levadura se puedan identificar o seleccionar por incubación en un medio líquido, varíe dependiendo de la población y pueda determinarse fácilmente por incubación de una pequeña parte de la población en el medio líquido con cada repetición de las etapas (b) y (c). Por lo tanto, el método puede comprender:
- 10 (a) proporcionar una población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces*;
- (b) cultivar las células de levadura en condiciones que permitan el cruzamiento de las células de levadura;
- 15 (c) identificar o seleccionar las células de levadura incubando células de levadura en un medio líquido que contenga xilosa;
- (d) repetir las etapas (b) y (c) formando las células identificadas o seleccionadas la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante de *Saccharomyces*, hasta que una o más células de levadura hayan adquirido la capacidad de crecer con la tasa de crecimiento deseada usando xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.
- 20

Las células de levadura se incuban generalmente en o sobre un medio que contenga xilosa durante el tiempo suficiente para permitir crecer a las células de levadura capaces de crecer usando la xilosa como única fuente de carbono. Como se ha analizado anteriormente, el período de tiempo será al menos un tiempo suficiente para permitir que las células de levadura tengan una mayor tasa de crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono para crecer. Generalmente, la cantidad de tiempo será un tiempo suficiente para permitir el crecimiento de las células de levadura que no tienen una tasa aumentada de crecimiento usando xilosa como única fuente de carbono.

25 En otras palabras, el período de tiempo será suficiente para permitir crecer sustancialmente en xilosa a todas las células de levadura. El período de tiempo puede variar dependiendo de la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante y también variará dependiendo de los tipos de medio usado y de cómo se han realizado algunos ciclos o repeticiones de las etapas (b) y (c). Mientras cada ciclo se repite, se considera que el tiempo será inferior ya que el procedimiento identifica o selecciona a las poblaciones que crecen más rápido usando xilosa con cada repetición de las etapas (b) y (c), independientemente de si se usa medio líquido o sólido. Los expertos en la materia también apreciarán que incluso en un medio complejo que contenga azúcares distintos de la xilosa, se considere que algunos o todos los azúcares distintos de la xilosa se agoten eventualmente a través del crecimiento, y que la presencia de la xilosa otorgue por tanto eventualmente una ventaja selectiva a las cepas que crezcan más rápido usando la xilosa como única fuente de carbono.

30

Las células de levadura pueden incubarse en un medio líquido que contenga xilosa durante el tiempo suficiente para permitir que las células de levadura sean más eficaces creciendo en xilosa como única fuente de carbono para crecer más que las células de levadura que sean menos eficaces creciendo en xilosa. Generalmente la cantidad de tiempo es suficiente para permitir crecer incluso a aquellas células de levadura que no tengan una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono. Como se ha analizado anteriormente, las células que crecen más rápido serán mayores en número y por lo tanto, seleccionadas. Por lo tanto, el uso de un medio líquido que contenga xilosa proporciona un modo conveniente para seleccionar aquellas células de levadura que sean capaces de utilizar xilosa a una tasa mayor que el resto de la población de células de levadura. El período de crecimiento en un medio líquido que contenga xilosa se reduce generalmente con cada ciclo a medida que las células de levadura identificadas o seleccionadas lleguen a ser más eficaces utilizando xilosa. Después de la identificación o selección de las células de levadura por cultivo de las células en un medio líquido que contenga xilosa, las células se recogen generalmente del medio líquido y se cruzan sin una separación o aislamiento posterior de las células. Por lo tanto, las células de levadura identificadas o seleccionadas se cruzan generalmente como en una mezcla. Los métodos de cruzamiento son los mismos que aquellos que siguen la identificación y selección en un medio sólido que contenga xilosa.

40

45

50

Se apreciará que las células de levadura se puedan incubar en o sobre un medio que contenga xilosa en condiciones que seleccionen o identifiquen las cepas de levadura que utilicen xilosa en las poblaciones. A modo de ejemplo, las poblaciones se podrían cultivar:

- 60 (a) en o sobre un medio mínimo de xilosa en condiciones aeróbicas, microaerófilas y anaerobias;
- (b) en o sobre un medio rico en xilosa en condiciones aeróbicas, microaerófilas y , anaerobias.

65 El medio anterior puede incluir otras fuentes de carbono (por ejemplo azúcares tales como la glucosa, galactosa, polioles tales como el xilitol, glicerol, ácidos orgánicos y sus sales tales como el ácido acético y acetatos etc.) además de xilosa. Por ejemplo, las células de levadura se pueden exponer a tensiones tales

como pH sub o supraóptimo, presión hiper o hipoosmótica, tensión iónica de las sales, estrés alcohólico por adición de etanol u otros alcoholes, estrés por otros inhibidores orgánicos tales como furfural y sus derivados, temperaturas sub o supraóptimas, presencia o ausencia de xilosa y posteriormente seleccionarse o identificarse por su capacidad para recuperarse de las tensiones mientras utilizan xilosa como única fuente de carbono. Se espera que las combinaciones de diferentes condiciones selectivas se pudieran aplicar a las poblaciones.

5 Se apreciará que la etapa (c) se puede repetir cualquier número de veces antes del aislamiento de células de levadura o de repetir la etapa (b). Por ejemplo, se pueden realizar subcultivos de forma continuada de las poblaciones seleccionadas en el medio líquido que contiene xilosa en un medio reciente hasta una identificación o selección adicionales para que las células de levadura tengan la tasa de crecimiento deseada.

10 Los expertos en la materia también apreciarán que las etapas (b) y (c) se pueden repetir cualquier número de veces para seleccionar o identificar las células de levadura no recombinante en las que la tasa de crecimiento en xilosa como única fuente de carbono se incrementa progresivamente con cada ciclo de repetición. Por lo tanto, este proceso se repite el número de veces que sea necesario para obtener una cepa que presente la tasa de crecimiento deseada utilizando la xilosa como única fuente de carbono.

15 A continuación, el procedimiento comprende generalmente la etapa aislar una o más células de levadura que tengan la tasa de crecimiento deseada. Las personas expertas en la materia apreciarán que el método generalmente produce una población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* no recombinante que presentan la tasa de crecimiento deseada. Por consiguiente, en una realización, el método se puede usar para producir una población de cepas de *Saccharomyces* que sean capaces de crecer utilizando la xilosa como única fuente de carbono a una tasa de crecimiento deseada. La población se puede aislar sin separar las cepas individuales. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por simple combinación de la población de cepas de *Saccharomyces* que se producen mediante este método.

20 En otra realización, se pueden aislar las cepas individuales de *Saccharomyces* que son capaces de crecer utilizando la xilosa como única fuente de carbono. Esto se puede conseguir usando técnicas microbiológicas convencionales tales como proveer colonias adecuadas, sembrar en estrías, en placas de agar, la levadura con las colonias aisladas individualmente, o cualquier otro método de aislamiento de cultivos puros. Dichos métodos se describen en Cruickshank et al. (1975) "Medical Microbiology", 12ª edición, volumen II: The practice of medical microbiology, publicado por Churchill Livingstone.

25 También se describe un método para generar un derivado de una cepa de *Saccharomyces* con una tasa de crecimiento aumentada en xilosa como única fuente de carbono para el crecimiento. La cepa de *Saccharomyces* de la que se genera el derivado generalmente tiene una propiedad deseada. El método comprende la etapa (a) que proporciona la cepa como parte de una población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* no recombinante. En otras palabras, las células de levadura de la cepa constituyen una parte de la población. Las células de levadura de la población genéticamente diversa se pueden obtener a partir de cualquiera de las fuentes mencionadas anteriormente. En la etapa (b), las células de levadura de la población de células de levadura genéticamente diversa se cultivan en cualquiera de las condiciones mencionadas anteriormente para permitir el cruzamiento de las células de levadura de la población. En la etapa (c), las células de levadura se identifican y se seleccionan a partir de derivados que posean una tasa de crecimiento aumentada. La tasa de crecimiento aumentada significa un aumento en la tasa de crecimiento del derivado con respecto a la tasa de crecimiento de la cepa. Generalmente, las células de levadura se identifican o se seleccionan incubando la célula de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa como se ha mencionado anteriormente. El medio que contiene xilosa puede contener además factores que seleccionan o identifican para la cepa derivada. Por ejemplo, la cepa puede comprender marcadores de selección tales como marcadores de resistencia a antibióticos u otros tipos de marcadores que permitan distinguir a los derivados de la cepa de otras células de levadura de la población genéticamente diversa de células de levadura. Esto permite una identificación o selección simultáneas para las células de levadura que posean una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono, y que incluyen el marcador de selección. Esto permite distinguir los derivados del resto de la población genéticamente diversa. Los marcadores de selección adecuados incluyen, por ejemplo, ADE2, HIS3, LEU2, URA3, LYS2, MET15, TRP1, URA4, resistencia al sulfito o resistencia a la p-fluoro-DL-fenil-alanina (Cebollero y González (2004) Applied and Environmental Microbiology, Vol 70: 7018-7028). Los métodos para la identificación y selección de crecimiento usando xilosa son los que se han mencionado anteriormente. Las etapas (b) y (c) se pueden repetir cualquier número de veces hasta que se obtenga un derivado con una tasa de crecimiento aumentada. Una vez que se ha aumentado la tasa de crecimiento, se aísla el derivado. Los métodos para el aislamiento son los que se han mencionado anteriormente.

30 También se describe la producción de cepas de *Saccharomyces* mediante el método de la invención. La cepa *Saccharomyces* puede ser cualquier especie de *Saccharomyces* según se define filogenéticamente por Kurtzman (2003) FEMS Yeast Research 3: 417-432, e incluyen *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus* y *S. bayanus*. Los métodos para el cruzamiento entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y no *cerevisiae* se analizan, por ejemplo, en Johnston JR y Oberman H (1979) Yeast Genetics in Industry,

en Bull MJ (ed.) Progress en Industrial Microbiology, Elsevier, Amsterdam Vol. 15, págs. 151-205; en Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of wine making. Yeast 16: 675-729; en P.V. Attfeld and P.J.L Bell (2003) Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts, Topics in Current Genetics Vol. 2, J.H. de Winde (Ed) Functional Genetics of Industrial Yeasts, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Las personas expertas en la materia apreciarán que una vez que se obtiene una cepa de *Saccharomyces* que es capaz de utilizar la xilosa como única fuente de carbono para crecer con una tasa deseada, se pueden derivar cepas de esa cepa usando métodos para producción de cepas conocidos en la materia que incluyen, por ejemplo, métodos clásicos de cruzamiento genético, métodos mutagenéticos, métodos recombinantes, o cualquier otro método para generar cepas de *Saccharomyces*.

La cepa capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono se puede cruzar con otras cepas de *Saccharomyces*, preferentemente con otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Por ejemplo, se contempla que los métodos descritos anteriormente puedan producir múltiples cepas de *Saccharomyces* que sean capaces de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para crecer. Por lo tanto, una primera cepa capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono se puede cruzar con una segunda cepa capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para crecer. Los cruzamientos de este tipo se pueden realizar, por ejemplo, para obtener una cepa de *Saccharomyces* con una capacidad incluso más aumentada o mejorada de utilizar la xilosa como única fuente de carbono. Por ejemplo, se contempla que las diferentes cepas de *Saccharomyces* que son capaces de un rápido crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono se pueden cruzar para obtener cadenas cruzadas que sean capaces de un rápido crecimiento usando la xilosa como única fuente de carbono, o que sean más eficaces al producir sustancias como el etanol o el dióxido de carbono cuando usen la xilosa como única fuente de carbono.

Las cepas de *Saccharomyces* que son capaces de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono se pueden cruzar con cepas de *Saccharomyces* que sean menos capaces de utilizar la xilosa como única fuente de carbono. Los cruzamientos de este tipo se pueden realizar, por ejemplo, para transferir la capacidad mejorada de utilizar la xilosa como única fuente de carbono a una cepa de *Saccharomyces* que tenga una o más propiedades deseables que no se encuentren en la cepa que tiene la capacidad mejorada de utilizar la xilosa como única fuente de carbono. Por ejemplo, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* menos capaz de utilizar la xilosa como única fuente de carbono para crecer puede tener características deseables para la industria panificadora, y puede ser ventajoso cruzar esta cepa con una cepa que sea capaz de crecer a una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para desarrollar una levadura del pan que pueda crecer con mayor rapidez y eficiencia en xilosa y que se pueda usar posteriormente en aplicaciones de panadería. De forma análoga, las levaduras que se pueden usar para otros propósitos industriales como la destilación, elaboración de vinos, extractos de levaduras, enzimas, proteínas heterólogas, o cualquier otro propósito se pueden cruzar con cepas que tengan una capacidad mejorada de utilizar la xilosa como única fuente de carbono para permitir la producción de biomásas o productos secundarios de la levadura en un medio de xilosa.

Por cruzamiento de una cepa de *Saccharomyces*, por ejemplo, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, en la que la capacidad de crecimiento a una tasa de una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono, se obtiene mediante métodos no recombinantes con una cepa recombinante en la que se han introducido uno o más genes para la utilización de xilosa mediante métodos recombinantes, se contempla que se pueden producir cepas incluso con mejoras adicionales en la utilización de xilosa. Los expertos en la materia apreciarán que los genes que se han introducido de manera recombinante para la utilización de xilosa simplemente complementarían a aquellos genes ya presentes en la cepa mediante métodos no recombinantes.

También apreciarán las personas expertas en la materia que aunque la capacidad de utilizar xilosa se obtiene por métodos no recombinantes, se puede usar la tecnología de ADN recombinante para complementar la capacidad de la cepa para utilizar xilosa como única fuente de carbono. Por ejemplo, se pueden introducir en la cepa uno o más genes de utilización de xilosa a partir de otras fuentes para complementar la utilización de xilosa. Por ejemplo, la xilosa isomerasa de *Piromyces sp.* se puede integrar en el genoma, como se describe en Kuyper et al., simplemente para complementar la utilización de xilosa. La xilosa reductasa (XYL 1), o la xilitol deshidrogenada (XYL2) de *Pichia stipitis* se pueden clonar en *Saccharomyces*, como se describe en Wahlbom et al., (2003) para complementar la capacidad de la cepa para utilizar la xilosa. Sin embargo, las personas expertas en la materia comprenderán que la adición de secuencias para la utilización de la xilosa mediante métodos recombinantes es simplemente para complementar la capacidad existente en las cepas de una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono.

En un ejemplo adicional, en las cepas no recombinantes se podrían introducir uno o más genes que codifican las actividades metabólicas que podrían repercutir sobre la eficacia de la utilización de xilosa por *Saccharomyces* por otros medios distintos a la acción directa en xilosa, xilitol o xilulosa, y se podría modificar su expresión usando

técnicas de ADN recombinante. En algunos casos podría ser deseable aumentar la expresión de determinados genes mientras que en otros casos sería deseable reducir o eliminar la expresión de determinados genes. Los genes diana para modificar la expresión incluirían los que codifican actividades metabólicas citoplasmáticas, mitocondriales o de cualquier otro orgánulo. Dichos genes podrían codificar actividades implicadas en el transporte de azúcares, transporte de nutrientes, glucólisis, etapas finales de la fermentación, la ruta de la pentosa fosfato, la gluconeogénesis, la ruta del ácido tricarbóxico, el ciclo del glioxilato, la cadena de transporte de electrones, el equilibrio redox intracelular, la interacción entre fermentación y respiración, el metabolismo y la síntesis de aminoácidos, etc. Los ejemplos de genes que se podrían modificar mediante tecnologías de ADN recombinante incluyen *RPE1*, *RK11*, *TAL1*, y *TKL1* o cualquier otro gen que pudiera mejorar la capacidad de las levaduras para usar la xilosa como única fuente de carbono.

Adicionalmente, una persona experta en la materia apreciará que, en la cepa, se pueden introducir uno o más genes de utilización de xilosa usando métodos recombinantes. Los métodos para la producción de levaduras recombinantes se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Guthrie y Fink (1991) "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology Vol 194, Academic Press. Los genes o las secuencias de interés se pueden clonar en vectores adecuados para la transformación en la célula de levadura. El gen o la secuencia de interés se clona en un vector de expresión adecuado tal como pMA91 (Dobson et al. (1984) EMBO Journal 3:1115), que comprende las regiones reguladoras adecuadas para la expresión en la cepa de levadura. Otros vectores incluyen vectores de expresión episomales, centrómicos, integradores, modificados, conocidos por los expertos en la materia (véase por ejemplo Guthrie y Fink (1991) "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press). Las regiones reguladoras que pueden ser adecuadas para la expresión en levaduras pueden incluir, por ejemplo, MAL, PGK1, ADH1, GAL1, GAL10, CUP1, GAP, CYC1, PH05. Como alternativa, se pueden usar las regiones reguladoras del propio gen para expresar el gen en *Saccharomyces*. El gen o la secuencia de interés se pueden integrar en el genoma de la levadura, tal como por ejemplo en el locus del ARN ribosomal. Para este propósito, se liberan las secuencias ribosomales de un vector adecuado (por ejemplo el plásmido pIRL9) y se clonan apropiadamente con un vector BS+. El gen o la secuencia de interés se une operativamente a un promotor adecuado de levadura y a regiones de terminación para formar un casete de expresión, y el casete de expresión se clona posteriormente en las secuencias ribosomales clonadas. A partir de este plásmido resultante, el casete de expresión, flanqueado por secuencias ribosomales, se puede liberar como un fragmento sencillo usando enzimas de restricción apropiadas. El fragmento liberado se puede cotransformar con un plásmido que se replica de forma autónoma y que incluye un marcador adecuado para la transformación en una levadura utilizando métodos conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Guthrie y Fink (1991) "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", Methods in Enzymology Vol 194, Academic Press). Después, el plásmido se puede eliminar de la célula cultivando las células en condiciones que no sean selectivas para el plásmido.

La cepa de *Saccharomyces* spp. de la presente invención se puede usar para cualquier uso que se pudiera dar a la cepa de *Saccharomyces* spp. de esta especie. Por ejemplo, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que sea capaz de utilizar la xilosa como única fuente de carbono se puede usar en la elaboración de pan y cerveza, en la producción de biomasa, en la fermentación de azúcar y en la producción de etanol, o cualquier otro uso para el que se use la cepa de *Saccharomyces* convencional.

La capacidad de la cepa de *Saccharomyces* de la presente invención para crecer en xilosa como única fuente de carbono proporciona un fenotipo determinado que se puede usar para distinguir entre la cepa de *Saccharomyces* que es capaz de crecer con tasas de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono, y aquellas que no sirven para el propósito de "fabricar" cepas de levadura.

La presente memoria descriptiva desvela un procedimiento para fabricar una cepa de *Saccharomyces*, que comprende las siguientes etapas:

- (a) cultivar la cepa deseada con una cepa de la presente invención en condiciones que permitan combinar el ADN de las cepas; y
- (b) seleccionar o identificar derivados de la cepa deseada que posean una tasa de crecimiento aumentada usando xilosa como única fuente de carbono para crecer;
- (c) aislar derivados de la cepa deseada que posean una tasa de crecimiento aumentada usando xilosa como única fuente de carbono para crecer.

Generalmente, el método comprende:

- (a) cruzarla cepa deseada con una cepa de *Saccharomyces* del cuarto al decimocuarto aspecto en condiciones que permitan la combinación del ADN de las cepas; e
- (b) identificar o seleccionar un derivado de la cepa deseada que sea capaz de crecer con una tasa superior a una generación cada 48 horas usando xilosa como única fuente de carbono incubando en placas las

células cruzadas en un medio sólido que contenga xilosa o cultivando en un medio líquido que contenga xilosa, o una combinación de ambos;

- 5 (c) aislar los derivados de la cepa deseada que posean una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono para crecer.

10 Las cepas marcadas se pueden detectar incubando la cepa sobre o en un medio mínimo que contenga xilosa y determinando la tasa de crecimiento, o comparando la tasa de crecimiento con respecto a la de la cepa convencional que tiene una tasa de crecimiento conocida sobre o en un medio que contiene xilosa. Un ensayo adecuado para la detección de una cepa marcada es el Ensayo T1, mediante el cual una cepa marcada presenta un incremento al menos dos veces superior en biomasa en el Ensayo T1.

15 En otra realización, la cepa de *Saccharomyces* spp. de la presente invención se puede usar para la producción de compuestos como etanol, xilitol, ácido acético, otros productos secundarios de la levadura, enzimas, etc. Los métodos de producción de compuestos pueden comprender las siguientes etapas:

- 20 (a) cultivar la cepa de *Saccharomyces* en un medio que contenga xilosa en condiciones que permitan a la cepa producir el compuesto; y
 (b) recuperar el compuesto (o compuestos) que produce la cepa.

25 Los compuestos producidos por *Saccharomyces* cuando utiliza xilosa como única fuente de carbono, pueden ser uno o más compuestos o una mezcla de los mismos. Por ejemplo, el compuesto puede ser etanol, xilitol, ácido acético, dióxido de carbono o cualquier componente, metabolitos o productos secundarios de las células de levadura y su metabolismo. Los componentes de las células de levadura pueden incluir enzimas, cofactores, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ADN, ARN, componentes de la pared celular, glucanos, manoproteínas, componentes de membrana, lípidos, esteroides, hidratos de carbono de almacenamiento, trehalosa, glucógeno, ácidos orgánicos, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico o polioles tales como glicerol, xilitol.

30 Las personas expertas en la materia apreciarán que el tipo de compuestos producidos por la cepa de *Saccharomyces* spp. puede depender de las condiciones de crecimiento a las que se someta a la cepa. Por ejemplo, la temperatura, el crecimiento aerobio o anaerobio, el pH del medio, la fuente de nitrógeno, la presencia de otras fuentes de carbono distintas a la xilosa, otros compuestos en el medio por sí mismos o en combinación pueden afectar a los tipos de compuestos que produce la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, las condiciones exactas para la producción de cualquiera de uno o más compuestos se pueden determinar fácilmente por una persona experta en la materia mediante procedimientos convencionales.

40 También apreciarán las personas expertas en la materia que las cepas de *Saccharomyces* de la presente invención serán capaces de utilizar azúcares tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, sacarosa, melibiosa, rafinosa, xilosa, melecitosa, alfa-metil glucósido, trehalosa e isomaltosa. Las cepas también pueden ser capaces de usar fuentes de carbono que no sean azúcares, tales como etanol, acetato, glicerol y xilitol.

45 Generalmente, para producir dióxido de carbono y etanol, la cepa de la presente invención puede ser capaz de fermentar azúcares tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, sacarosa, melibiosa, rafinosa, xilosa, melecitosa, alfa-metil glucósido, trehalosa o isomaltosa además de la xilosa.

50 La xilosa presente en el medio que contiene xilosa puede estar en cualquier forma que pueda utilizar la levadura. Por ejemplo, la xilosa puede estar purificada, o puede estar en forma bruta tal como un hidrolizado de hemicelulosa obtenido a partir de hidrólisis ácida de biomasa tal como caña de azúcar, paja, rastrojo de maíz, productos de la madera, etc.

55 En la producción de biomasa y compuestos, el medio inoculado que contiene xilosa se cultiva generalmente a un intervalo de temperatura de entre 22 °C y 40 °C durante entre 2 horas y 4 días.

60 Adicionalmente los autores de la invención han descubierto que para producir etanol a partir de xilosa usando las cepas de la presente invención, no es necesario que las cepas presenten un crecimiento sustancial en la xilosa. Los autores de la invención han descubierto que los fuertes inóculos de medio que contiene xilosa con las cepas de la presente invención dan como resultado la producción de etanol en 2 horas, generalmente en 4 horas, más generalmente en 5 horas. En estas condiciones, no se detecta un crecimiento sustancial. Por tanto, se proporciona también un método para producir etanol que comprende:

- 65 (a) inocular un medio que contiene xilosa con una cepa, como se describe en el presente documento, a una densidad de al menos 1×10^8 células de levadura por ml. de medio;
 (b) incubar el medio inoculado durante un tiempo suficiente para permitir la producción de etanol;

(c) recuperar el etanol.

El medio que contiene xilosa podría ser cualquiera de los medios que contienen xilosa mencionados anteriormente.

La densidad de células de xilosa podría ser al menos de 5×10^8 , generalmente al menos de 6×10^8 células de levadura por ml. de medio.

El medio inoculado se podría incubar durante al menos 2 horas, generalmente al menos 5 horas.

En otro aspecto, se proporciona un método para la producción de etanol que comprende incubar una cepa de *Saccharomyces* no recombinante en un medio que contenga xilosa en condiciones suficientes para producir etanol y posteriormente recuperar el etanol.

Definición de los Ensayos T1 a T9.

T1: Crecimiento usando xilosa como única fuente de carbono

Las cepas de levadura se siembran en estrías en un medio de glucosa, extracto de levadura, peptona bacteriológica, solidificado con agar al 2% usando técnicas microbiológicas convencionales. Tras incubar durante 72 horas a 30 °C, las células de levadura se recogen de las placas usando un asa bacteriológica estéril y se inoculan a una DO_{600} (densidad óptica a 600 nm) de entre 0,1 y 0,2 unidades (DO_{600} a T_0) en 50 ml de caldo. El caldo contiene xilosa (5% p/v), base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (0,67%) en agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Los cultivos se incuban a 30 °C con agitación a 220 rpm (10 cm. de diámetro orbital) durante 48 horas antes de medir la DO_{600} (DO a T_{48h}). El aumento en veces de biomasa se determina mediante la ecuación:

$$\frac{DO_{600} \text{ a } T_{48h}}{DO_{600} \text{ a } T_0}$$

T2: Rendimiento de biomasa celular usando xilosa como única fuente de carbono.

Las cepas de levadura se siembran en estrías en un medio de glucosa, extracto de levadura, peptona bacteriológica, solidificado con agar al 2% usando técnicas microbiológicas convencionales. Tras incubar durante 72 horas a 30 °C, las células de levadura se recogen de las placas usando un asa bacteriológica estéril y se inoculan a una DO_{600} (densidad óptica a 600 nm) de 0,1 a 0,2 unidades (DO_{600} a T_0) en 50 ml de caldo. El caldo contiene xilosa (5% p/v), base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (0,67%) en agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Los cultivos se incuban a 30 °C con agitación a 220 rpm (10 cm. de diámetro orbital) durante 48 horas y posteriormente se toma la medida del rendimiento de materia seca de levadura. El contenido en peso seco de la levadura se mide mediante la transferencia de 5 ml de cultivo celular a un tubo de ensayo de cristal que se ha pesado previamente (W_1), seguido de una centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 22 °C. El sobrenadante se elimina sin modificar el sedimento de levadura, las células se suspenden nuevamente en 5 ml de agua destilada, y después se centrifuga de nuevo a 3000 g durante 10 minutos a 22 °C. Se elimina de nuevo el sobrenadante sin modificar el sedimento de levadura, las células se suspenden nuevamente en 5 ml de agua destilada, y después se centrifuga de nuevo a 3000 g durante 10 minutos a 22 °C.

El tubo de ensayo de vidrio que contiene las células de levadura se calienta en un horno a 105 °C durante 24 horas y se pesa (W_2). La cantidad de materia seca de levadura se calcula restando W_1 de W_2 y multiplicando el valor obtenido por 10. Los ensayos se realizan por duplicado y se calcula la media aritmética.

T3: Producción de etanol usando xilosa como única fuente de carbono.

El inóculo de levadura se preparó mediante crecimiento de una siembra microbiana convencional de células puras de la cepa durante 16 h a 30 °C con agitación a 200 rpm en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 ml de agua destilada, 2,5 g de xilosa, 0,5 g de extracto de levadura y 0,5 g de peptona bacteriológica. Siete cultivos de 50 ml crecieron simultáneamente. Se recogieron los cultivos por centrifugación a 22 °C y 3000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y los sedimentos de células se suspendieron de nuevo en agua destilada estéril y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante se desechó y los sedimentos de células se suspendieron de nuevo y se agruparon en 20 ml de un medio con contenido mínimo de xilosa que contenía los siguientes componentes por litro de agua destilada:

50 g de xilosa, 13,4 g de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos, complementada con 0,4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 1 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1 mg de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 2 mg de pantotenato de calcio, 2 mg de hidrocloreto de tiamina, 2 mg de hidrocloreto de piridoxina, 4 mg de inositol, 1 mg de ácido nicotínico, y 0,4 mg de biotina.

Posteriormente, las células se inocularon en un matraz de fermentación Braun Biostat B 2L con 980 ml del mismo medio con contenido mínimo en xilosa que se había precalentado a 30 °C y oxigenado al 20% de oxígeno. Las levaduras crecieron con bombeo de aire a 20 l por minuto, agitación a 1200 rpm y manteniendo el pH en 5 usando z

adiciones de KOH o ácido fosfórico según se requiriera. Después de 24 h, se retiraron 300 ml del volumen de cultivo y se reemplazaron con 300 ml de medio reciente con un contenido mínimo de xilosa que constaba de 50 g de xilosa y 10 g de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos y las sales y vitaminas traza descritas anteriormente. Después de más de 7 horas se añadieron al cultivo 30 g de xilosa reciente, el suministro de aire se redujo a 4 l por minuto y la velocidad de agitación se redujo a 200 rpm. Después de 20 horas se analizó el etanol usando un analizador bioquímico YSI 2700 Select equipado con una membrana YSI 2786 para la detección de etanol (YSI Inc. Yellow Springs, Ohio, USA).

T4: Ensayo de xilosa reductasa

10 Las cepas de levadura crecieron en el agar con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica, como se ha descrito anteriormente, se inocularon con una densidad óptica a 600 nm de 0,1 a 0,2 unidades en un matraz de agitación de 250 ml con 50 ml de medio que contenía xilosa al 5% p/v, extracto de levadura al 0,5% y peptona bacteriológica al 1% p/v (YYP). Se incubaron los cultivos a 30 °C y 180 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 3 a 5 unidades. No obstante, las células no se recogían si no alcanzaban la densidad óptica requerida tras 24 horas de incubación. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 x g y a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó, el sedimento de células se suspendió de nuevo en agua destilada muy fría y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se desechó y el proceso se repitió hasta que se eliminaron todas las trazas del medio.

20 Las células se suspendieron de nuevo en un tampón de disolución y se prepararon los extractos celulares como se describe en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs. 3381-3386. Después se analizaron los extractos celulares para conocer la actividad de xilosa reductasa de acuerdo con los métodos descritos y a los que se hace referencia en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs. 3381-3386. Se define una unidad de actividad como un nanomol de NAD(P)H reducido u oxidado por minuto y por gramo de proteína a 30 °C. Se analizaron las proteínas mediante el método descrito por Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, y Randall RJ (1951) Journal of Biological Chemistry 193:265-275, usando una albúmina de suero bovino convencional.

T5: Ensayo de xilitol deshidrogenasa.

30 Las cepas de levadura crecieron en el agar con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica, como se ha descrito anteriormente, se inocularon con una densidad óptica a 600 nm de 0,1 a 0,2 unidades en un matraz de agitación de 250 ml con 50 ml de medio que contenía xilosa al 5% p/v, extracto de levadura al 0,5% y peptona bacteriológica al 1% p/v (YYP). Se incubaron los cultivos a 30 °C y 180 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 3 a 5 unidades. No obstante, las células no se recogían si no alcanzaban la densidad óptica requerida tras 24 horas de incubación. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 x g y a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó, el sedimento de células se suspendió de nuevo en agua destilada muy fría y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se desechó y el proceso se repitió hasta que se eliminaron todas las trazas del medio.

40 Las células se suspendieron de nuevo en un tampón de disolución y se prepararon los extractos celulares como se describe en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs. 3381-3386. Después se analizaron los extractos celulares para conocer la actividad de xilitol reductasa de acuerdo con los métodos descritos y a los que se hace referencia en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs. 3381-3386. Se define una unidad de actividad como un nanomol de NAD(P)H reducido u oxidado por minuto y por gramo de proteína a 30 °C. Se analizaron las proteínas mediante el método descrito por Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, y Randall RJ (1951) Journal of Biological Chemistry 193:265-275, usando una albúmina de suero bovino convencional.

T6: Ensayo de xilulosa quinasa.

50 Las cepas de levadura crecieron en el agar con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica, como se ha descrito anteriormente, se inocularon con una densidad óptica a 600 nm de 0,1 a 0,2 unidades en un matraz de agitación de 250 ml con 50 ml de medio que contenía xilosa al 5% p/v, extracto de levadura al 0,5% y peptona bacteriológica al 1% p/v (YYP). Se incubaron los cultivos a 30 °C y 180 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 3 a 5 unidades. No obstante, las células no se recogían si no alcanzaban la densidad óptica requerida tras 24 horas de incubación. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 x g y a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó, el sedimento de células se suspendió de nuevo en agua destilada muy fría y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se desechó y el proceso se repitió hasta que se eliminaron todas las trazas del medio.

60 Las células se suspendieron de nuevo en tampón de disolución y se prepararon los extractos celulares como se describe en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs. 3381-3386. Después se analizaron los extractos celulares para conocer la actividad de xilulosa quinasa de acuerdo con los métodos descritos y a los que se hace referencia en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs. 3381-3386. Se define una unidad de actividad como un nanomol de NAD(P)H reducido u oxidado por minuto y por gramo de proteína a 30 °C. Se analizaron las proteínas mediante el método descrito por Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, y Randall RJ (1951) Journal of Biological Chemistry 193:265-275,

usando una albúmina de suero bovino convencional.

T7: Crecimiento usando xilitol como única fuente de carbono.

- 5 Las cepas de levadura se sembraron en estrías en un medio de glucosa, extracto de levadura, peptona bacteriológica, solidificado con agar al 2% usando técnicas microbiológicas convencionales. Tras incubar durante 72 horas a 30 °C, las células de levadura se recogen de las placas usando un asa bacteriológica estéril y se inoculan a una DO_{600} (densidad óptica a 600 nm) de 0,1 a 0,2 unidades (DO_{600} a T_0) en 50 ml caldo. El caldo contiene xilitol (5% p/v), base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (0,67%) en agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Los cultivos se incuban a 30 °C con agitación a 220 rpm (10 cm. de diámetro orbital) durante 48 horas antes de medir la DO_{600} (DO a T_{48h}). El aumento relativo de biomasa se determina mediante la ecuación:

$$\frac{DO_{600} \text{ a } T_{48h}}{DO_{600} \text{ a } T_0}$$

T8: Producción de etanol usando xilosa en un medio rico.

- 15 Las cepas de levadura se sembraron en estrías en un medio de glucosa, extracto de levadura, peptona bacteriológica, solidificado con agar al 2% usando técnicas microbiológicas convencionales. Tras incubar durante 96 horas a 30 °C, las células de levadura se recogen de las placas usando un asa bacteriológica estéril y se inoculan a una DO_{600} (densidad óptica a 600 nm) de 1 a 2 unidades en 50 ml de caldo. El caldo contiene xilosa (5% p/v), extracto de levadura (0,5% p/v), y peptona bacteriológica (1% p/v) en agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Los cultivos se incuban a 30 °C con agitación a 220 rpm (10 cm. de diámetro de rotación). Se analizan las muestras del sobrenadante del cultivo cada hora durante un periodo de 24 horas para determinar etanol usando un analizador bioquímico YSI 270,0 Select equipado con una membrana YSI 2786 para la detección de etanol (YSI Inc. Yellow Springs, Ohio, USA). Las concentraciones de etanol se expresan en gramos por litro.

T9: Producción de etanol en un medio mineral mínimo de xilosa en condiciones anaerobias.

- 25 Las cepas de levaduras se sembraron en estrías en un medio con xilosa al 5% p/v, base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos al 0,67% p/v, solidificado con agar al 2% usando técnicas microbiológicas convencionales. Tras incubar durante 96 horas a 30 °C, las células de levadura se recogen de las placas y se inoculan directamente en un medio de 10 ml de xilosa estéril al 5% p/v y base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos al 0,67% p/v contenido en un tubo de ensayo PP estéril de un volumen de 15 ml (Cellstar, Greiner bio-one) con una densidad óptica a 600 nm de 0,1 a 0,4. El medio se reviste con 2 ml de aceite mineral estéril para inhibir la transferencia de oxígeno, se enrosca el tapón herméticamente y se incuban los tubos sin agitación a 30 °C. Las muestras para realizar el ensayo de etanol se recogieron usando pipetas Pasteur estériles, sin alterar el sedimento de células que se hubiera formado debido al crecimiento del inóculo original. El ensayo de etanol se realizó usando un analizador bioquímico YSI 2700 Select equipado con una membrana YSI 2786 para la detección de etanol (YSI Inc. Yellow Springs, Ohio, USA).

A continuación se describirá con detalle la presente invención mediante la única referencia de los siguientes ejemplos no limitantes.

40

Ejemplo 1

***Saccharomyces* es capaz de crecer lentamente usando xilosa como la única fuente de carbono.**

- 45 Se inoculó la cepa NL67 de *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura del pan (Higgins et al. (1999) Applied and Environmental Microbiology 65:680-685) sobre un medio mineral mínimo solidificado con y sin xilosa como única fuente de carbono y se incubó a 30 °C durante dos meses. Usando un microscopio óptico se observó que, en los dos tipos de placas, aparecían colonias microscópicas pero que las colonias en el medio que contenía xilosa se detectaban más que las que no contenían ninguna fuente de carbono. Mientras que las células en el medio que no contenía xilosa se habían desarrollado a través de 5 ó 6 generaciones, las células en el medio que contenía xilosa se habían desarrollado a través de 9 ó 10 generaciones.

Ejemplo 2

- 55 Generación de poblaciones que comprenden diversas cepas de *Saccharomyces* capaces de crecer rápidamente en xilosa como única fuente de carbono.

- 60 Obteniendo cepas de levadura a partir de diversas fuentes, que incluyen cepas obtenidas de fermentaciones silvestres, del vino, de destilería y de cerveza, y de aplicaciones panificadoras, induciéndolas a esporular y usando técnicas de cruzamiento masivo para generar una población genéticamente diversa, fue posible aplicar presión selectiva para obtener un enriquecimiento de cepas de levadura capaces de crecer de manera más vigorosa usando xilosa como única fuente de carbono. Esparciendo las poblaciones genéticamente diversas sobre un medio mineral mínimo con xilosa (y de forma simultánea sobre el mismo medio mineral mínimo sin ninguna fuente de carbono) e

incubándolas durante dos meses, se observó que había una heterogeneidad en el tamaño de la colonia. Comparando las placas con xilosa y sin xilosa, se observó que contrariamente al dogma aceptado, el crecimiento se debía a la adición de xilosa en el medio; lo que implicaba que, en la población, había heterogeneidad en cuanto a la capacidad de las cepas de levadura para crecer en xilosa. Recogiendo toda la población que crecía en xilosa, y esporulándola, fue posible generar nuevas poblaciones de levadura que estaban enriquecidas con información genética que les otorgaba la capacidad de crecer de manera más eficaz en xilosa. Usando grandes tamaños de población (al menos 100.000) y agrupando las células, incluyendo las que no crecían de forma óptima, la diversidad genética de la población se mantuvo en cada generación. Dado que el número de ciclos de cruzamiento y selección aumentaba, la heterogeneidad de los tamaños de las colonia se mantuvo pero el tamaño final de las colonias aumentó.

Después de entre cinco y veinte ciclos de selección en placas de agar, se introdujeron las poblaciones en cultivos líquidos que contenían un medio mineral mínimo con xilosa como única fuente de carbono, y se continuó subcultivando durante aproximadamente 50 generaciones. Se esporularon las siguientes poblaciones y las nuevas poblaciones se construyeron por cruzamiento masivo. Las nuevas poblaciones de células de *Saccharomyces* heterogéneas crecieron en cultivos líquidos en medio mínimo que contenía xilosa durante aproximadamente 50 generaciones. Después de este periodo de tiempo algunas de las muestras se almacenaron y otras esporularon. Las esporas germinadas derivadas de la población seleccionada se cruzaron en masa para generar una nueva población de células de *Saccharomyces cerevisiae* heterogénea que crecía bajo presión de selección en medio mínimo líquido con xilosa durante aproximadamente 50 generaciones. Este proceso se puede repetir hasta conseguir las tasas de crecimiento deseadas.

Para determinar si se incrementaban las tasas de crecimiento de poblaciones en medio mínimo con xilosa, se inocularon las muestras tomadas después de 365, 569, 1013, 1059, 1170, y 1377 días de selección respectivamente en un medio mínimo con xilosa a una densidad óptica de 600 nm (DO) entre 0,1 y 0,2 con agitación a 220 rpm y temperatura de 30 °C. Se determinó nuevamente la DO tras 24 horas y se usó para calcular el tiempo medio de duplicación durante el periodo de tiempo de 24 horas de acuerdo con el método microbiológico convencional. Se representaron gráficamente los resultados y se muestran en la figura 1.

La figura 1 muestra que el aumento de la tasas de crecimiento masivo de las poblaciones es exponencial a medida que se desarrollan a través de las rondas de cruzamiento y selección para el crecimiento en xilosa como única fuente de carbono. Se supone que este aumento de la tasa de crecimiento en xilosa como única fuente de carbono continúe hasta que la tasa de crecimiento en xilosa sea equivalente a la tasa de crecimiento en glucosa como única fuente de carbono.

Ejemplo 3

La producción de etanol en un medio rico en xilosa mediante poblaciones heterogéneas de cepas de *Saccharomyces* no recombinante se correlaciona con la tasa de crecimiento en un medio mineral mínimo con xilosa.

Los tiempos de duplicación de las poblaciones en medio mínimo con xilosa se determinaron como se describe en el Ejemplo 2, Figura 1. Se determinó la producción de etanol mediante la inoculación de las muestras de las poblaciones a una densidad óptica de 600 nm de entre 1 y 2 en matraces de agitación de 250 ml en 50 ml de un medio que contenía xilosa al 5% p/v, extracto de levadura al 0,5% y peptona bacteriológica al 1% p/v (XYP). Se incubaron los cultivos a 30 °C con agitación a 220 rpm y la producción de etanol se controló durante un periodo de 2 días.

Los datos obtenidos (Tabla 1) indican que la capacidad para producir etanol en un medio rico en xilosa aumenta a medida que se reduce el tiempo de duplicación de las poblaciones heterogéneas en un medio mínimo con xilosa. Ambas características aumentaban conjuntamente con el número de repeticiones y con la cantidad de tiempo que se aplicaba al proceso de cruzamiento y selección.

Población	Tiempo de duplicación (h) en un medio mínimo con xilosa	Minutos de incubación en un medio rico con xilosa					
		1035 min.	1155 min.	1275 min.	1395 min.	1455 min.	2465 min.
1	142	0	0	0	0	0	0
2	76	0	0	0	0	0	0
3	17	0	0	0	0	0	.02
4	14	0	0	0	0,01	0,01	0,02
5	10	0	0	0,06	0,09	0,12	0,69
6	7	0,01	0,05	0,14	0,16	0,21	1,1

Los valores de la producción de etanol representan g de etanol / l producido en el tiempo (min.) indicado.

5

Ejemplo 4

Caracterización de cepas puras de *Saccharomyces* no recombinante capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono de acuerdo con los Ensayos T1 y T2.

10

Se purificaron aislados de la cepa de *Saccharomyces* a partir de las poblaciones del Ejemplo 2 que utilizaron xilosa mediante un procedimiento microbiológico convencional y se ensayaron para determinar el crecimiento y rendimiento en xilosa como única fuente de carbono de acuerdo con los Ensayos T1 y T2. Se incluyeron las cepas CEN.PK (Karhumaa et al. (2005) *Yeast* 22:259-368) y NL67 (Higgins et al. (1999) *Applied and Environmental Microbiology* 65:680-685) como tipos representativos de cepas existentes antes de la aplicación de los métodos descritos en el presente documento. Las cepas NM04/41257 y NM04/41258 (depositadas) proceden de las poblaciones que se habían desarrollado tras seguir durante 1059 días el protocolo descrito en el Ejemplo 2 y en la Figura 1. Las cepas ISO 10 (NM 05/45177) e ISO 7 (NM 05/45178) se obtuvieron a partir de poblaciones que se habían desarrollado tras seguir durante 1377 días y 1431 días, respectivamente, el protocolo descrito en el Ejemplo 2 y en la Figura 1. Se confirmó que las cepas de levadura aisladas individuales eran miembros de la especie *Saccharomyces cerevisiae* por esporulación y cruzamiento de haploides derivados posteriormente con cepas de laboratorio conocidas de *Saccharomyces cerevisiae* con marcadores genéticos.

15

20

Tabla 2. Crecimiento de cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio mínimo con xilosa según se describe en el Ensayo T1.

25

CEPA	Densidad óptica inicial	Densidad óptica final	Incremento en veces
CEN.PK	0,128	0,132	1,03
NL67	0,154	0,198	1,29
NM 04/41257	0,111	2,57	23,15
NM 04/41258	0,110	2,9	26,36
ISO 10 NM 05/45177	0,127	6,3	49,61
ISO 7 NM 05/45178	0,170	6,8,	40

Los rendimientos de biomasa de las cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio mínimo con xilosa se

- ensayaron como se describe en el Ensayo T2. Se incluyeron de nuevo las cepas CEN.PK y NL67 como tipos representativos de cepas que no se habían generado usando los métodos descritos en el presente documento. Rendimiento de CEN.PK = 1 mg de materia seca de levadura por 50 ml de cultivo; rendimiento de NL67 = 2 mg de materia seca de levadura por 50 ml de cultivo; rendimiento de NM04/41257 = 50 mg de materia seca de levadura por 50 ml de cultivo; rendimiento de NM04/41258 = 55 mg de materia seca de levadura por 50 ml de cultivo; rendimiento de ISO 10 = 145 mg de materia seca de levadura por 50 ml de cultivo; rendimiento de ISO 7 = 114 mg de materia seca de levadura por 50 ml de cultivo.
- Los datos anteriores indican que el protocolo genera cepas que poseen la capacidad de crecer rápidamente y dar un buen rendimiento usando xilosa como única fuente de carbono. Tomados en conjunto con los datos de las poblaciones del Ejemplo 2 y la Figura 1, los datos demuestran que el protocolo se puede aplicar de forma reiterada para obtener cepas derivadas que tengan una tasa máxima de crecimiento y rendimiento posible en xilosa, que podría ser equivalente a la tasa de crecimiento y rendimiento en glucosa.
- 15 Ejemplo 5**
- Las cepas de *Saccharomyces* no recombinantes son capaces de un crecimiento rápido y de producir etanol usando xilosa como única fuente de carbono.
- El inóculo de la cepa ISO 10 se preparó cultivando un asa microbiológica convencional de células puras de la cepa durante 16 horas a 30 °C con agitación a 200 rpm en un matraz Erlenmeyer que contenía, en 50 ml de agua destilada: 2,5 g de xilosa, 0,5 g de extracto de levadura y 0,5 g de peptona bacteriológica. De manera simultánea crecieron siete cultivos de 50 ml. Los cultivos se recogieron por centrifugación a 22 °C y 3000 x g durante 5 minutos.
- El sobrenadante se desechó y los sedimentos de células se suspendieron de nuevo en agua destilada estéril y se centrifugaron nuevamente. El sobrenadante se desechó y los sedimentos de células se suspendieron de nuevo y se agruparon en 20 ml de un medio mínimo con xilosa que contenía, por litro de agua destilada: 50 g de xilosa, 13,4 g de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos, complementada con 0,4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 2 mg de pantotenato de calcio, 2 mg de hidrocloreto de tiamina, 2 mg de hidrocloreto de piridoxina, 4 mg de inositol, 1 mg de ácido nicotínico, y 0,4 mg de biotina.
- Posteriormente, las células se inocularon en 980 ml del mismo medio mínimo con xilosa que se había precalentado a 30 °C y oxigenado al 20% de oxígeno en un recipiente de fermentación Braun Biostat B 2L. Las levaduras crecieron con bombeo de aire a 10 l por minuto, con agitación a 1200 rpm y manteniendo el pH a 5 usando adiciones de KOH o de ácido fosfórico según se requiriera. Después de 24 h, se retiraron 300 ml del volumen de cultivo y reemplazaron por 300 ml de medio mínimo con xilosa reciente que comprendía 50 g de xilosa y 10 g de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos y las sales y vitaminas traza en las cantidades descritas anteriormente. Esto proporcionó un cultivo con una masa celular equivalente a 4 g de levadura seca por litro. La aireación y agitación se mantuvo a 10 l/min. y a 1200 rpm, respectivamente, y el pH se mantuvo a 5. En estas condiciones la biomasa de levadura se duplicó en 4 horas (en base a la materia de levadura seca) con un rendimiento de 4 g de materia de levadura seca a partir de 10 g de xilosa consumida.
- Cuando la levadura se cultivó mediante el procedimiento descrito anteriormente alcanzó una densidad de aproximadamente 12 g (equivalente a levadura seca) por litro, se añadieron al cultivo 30 g de xilosa reciente, se redujo el suministro de aire a 4 l/min y se redujo la velocidad de agitación a 200 rpm. En estas condiciones, en las que no se detectó oxígeno disuelto, se consumieron 17 g de xilosa y se produjo adicionalmente 1 g de materia de levadura seca junto con 1,75 g de etanol por litro y 1 g de xilitol por litro en 20 horas.
- 50 Ejemplo 6**
- Actividades de la xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenada (HDH) y xiluloquinasa (XK) en el crecimiento exponencial de cepas de levadura no recombinante.
- Las cepas de levadura se cultivaron en agar con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica, como se describe en el Ensayo T1, se inocularon a una densidad óptica a 600 nm de entre 0,1 y 0,2 unidades en un matraz de agitación de 250 ml en 50 ml de un medio que contenía xilosa al 5% p/v, extracto de levadura al 0,5% y peptona bacteriológica al 1% p/v (YYP). Se incubaron los cultivos a 30 °C y a 180 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de entre 3 y 5 unidades. No obstante, las células se recogían y analizaban si, como en el caso de cepas tales como NL67 y CEN.PK, no alcanzaban la densidad requerida tras 24 horas de incubación. Las células se recogieron por centrifugación a 3.000 x g y a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó, el sedimento de células se suspendió de nuevo en agua destilada muy fría y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se desechó y el proceso se repitió hasta que se eliminaron todas las trazas del medio.
- Las células se suspendieron de nuevo en tampón de disolución y se prepararon los extractos celulares como se describe en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs 3381-3386.

Después se realizó el ensayo de los extractos celulares para determinar las actividades de XR, XDH y XK de acuerdo con los métodos descritos y a los que se hace referencia en Eliasson A., et al. (2000) Applied and Environmental Microbiology, volumen 66 págs. 3381-3386. Se encontraron las siguientes actividades, donde una unidad de actividad se define como un nanomol de NAD(P)H reducido u oxidado por minuto y por gramo de proteína a 30 °C.

Tabla 3. Unidades de actividades enzimáticas de cepas de levadura

Cepa	Actividad de XR	Actividad de XDH	Actividad de XK
CEN.PK	0,74	0,025	23
NL67	0,74	0,12	20,2
NM04/41257	1,16	1,09	20,9
NM04/41258	1,61	1,13	22,5
ISO 10	3,81	8,09	22,5
ISO 7	5,39	13,35	29,75

Estos datos sugieren que la metodología repetitiva de cruzamiento y selección aplicada para la obtención de levaduras que crecen en xilosa como única fuente de carbono ha dado como resultado una mejora de las actividades de XR y XDH que son críticas para el metabolismo de la xilosa y el xilitol.

Es probable que otras enzimas y actividades, tales como las implicadas en la ruta de la pentosa fosfato, también se hayan mejorado de manera natural en las cepas de la presente invención, debido a la presiones selectivas aplicadas en los métodos de reproducción y selección. Los expertos en la materia se darán cuenta de que las cepas de la presente invención podrían usarse de forma obvia como base para mejoras adicionales usando otras selecciones y combinaciones de reproducción, mutagénesis, fusión de protoplasto, citoducción y/o técnicas de ADN recombinante que optimicen las actividades de XR, XDH, XK, o introducir y optimizar la xilosa isomerasa, u otros cambios genéticos necesarios para mejorar el metabolismo de la xilosa, xilitol y xilulosa.

Ejemplo 7

Caracterización de las cepas puras de *Saccharomyces* no recombinante capaces de crecer en xilitol como única fuente de carbono de acuerdo con el Ensayo T7.

Se cultivaron cepas puras de levadura en agar con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica, como de describe en el Ensayo T7.

Las colonias de la cepa se inocularon en 50 ml de xilitol al 5% p/v y base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos al 0,67% p/v y se realizó un ensayo para determinar el crecimiento, como se describe en el Ensayo T7.

Tabla 4. Crecimiento de cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio mínimo con xilitol, como se describe en el Ensayo T7.

CEPA	Densidad óptica inicial	Densidad óptica final	Incremento en veces
CEN.PK	0,146	0,130	0,89
NL67	0,156	0,164	1,05
NM04/41257	0,130	0,171	1,32
NM04/41258	0,105	3,03	28,86
ISO 10	0,108	0,115	1,065
ISO 7	0,198	6,96	35,15

Estos datos sugieren que la metodología repetitiva de cruzamiento y selección aplicada para la obtención de levaduras que crecen en xilosa como única fuente de carbono ha dado como resultado algunas cepas que también pueden utilizar el xilitol como única fuente de carbono.

Ejemplo 8

Producción de etanol usando un medio rico con xilosa mediante cepas puras de *Saccharomyces* no recombinante capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono de acuerdo con el Ensayo T8.

Se cultivaron cepas de levadura en agar con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica, como se describe en el Ensayo T1, se inocularon a una densidad óptica a 600 nm de entre 1 y 2 unidades en un matraz de agitación de 250 ml en 50 ml de un medio que contenía xilosa al 5% p/v, extracto de levadura al 0,5% y peptona bacteriológica al 1% p/v (XYP) y se realizó un ensayo como se describe en el Ensayo T8.

Tabla 5. Producción de etanol usando un medio rico con xilosa.

CEPA	Densidad óptica inicial	Densidad óptica después de 24 h	Etanol (g/l) después de 24h
CEN.PK	1,16	1,9	0
NL67	1,29	1,8	0
NM04/41257	1,06	14,5	0,04
NM04/41258	1,17	17,2	0,07
ISO 10	1,18	20,0	0,66
ISO 7	1,15	21,2	1,32

Estos datos muestran que la estrategia de selección basada en el crecimiento de levaduras en xilosa como única fuente de carbono proporciona cepas de levadura que son capaces de producir etanol a partir de xilosa. Estos datos, en combinación con los del Ejemplo 3 (Tabla 1), muestran que la capacidad de crecimiento y rendimiento de biomasa de células usando xilosa como única fuente de carbono aumenta junto con el aumento de la capacidad para producir etanol a partir de xilosa. Además, cepas tales como NM04/41258 e ISO 7 que pueden utilizar xilosa y xilitol son capaces de producir etanol. El descubrimiento de que las cepas NM04/41258 e ISO 7 (NM 05/45178) que pueden utilizar xilitol y producir etanol a partir de xilosa va en contra de las enseñanzas de la Patente de los Estados Unidos N° 4.511.656, que indica que las cepas se deberían identificar para aislar la colonia o colonias específicas que utilicen D-xilosa pero no xilitol.

Ejemplo 9

Aislamiento y Caracterización de cepas puras de *Saccharomyces* no recombinante capaces de producir etanol usando xilosa como única fuente de carbono en condiciones anaerobias.

Se purificaron aislados de poblaciones que utilizaron xilosa que se habían sometido a 1106 días de selección y que fueron objeto del Ensayo T9. Se ensayaron cincuenta aislados individuales y se evaluó la producción de etanol después de tres semanas a cuatro meses, con intervalos de 0,24 g/l a 0,75 g/l. En estas evaluaciones también se incluyeron las cepas NM04/41257 y NM04/41258..

Tabla 6. Producción de etanol por cepas puras en un medio mínimo con xilosa en condiciones anaerobias.

Cepa	Período de incubación	Etanol producido en g/l
NM04/41257	4 meses	0,82
NM04/41258	4 meses	0,48
Aislado n° 2	1 mes	0,70
Aislado n° 6	1 mes	0,75
Aislado n° 21	1 mes	0,70
Aislado n° 23	1 mes	0,73
Aislado n° 31	3 meses	0,64
Aislado n° 36	3 meses	0,63
Aislado n° 37	3 meses	0,65

Estos datos indican que es posible obtener levaduras de *Saccharomyces* no recombinante que sean capaces de fermentar xilosa en condiciones anaerobias para producir etanol. Las cepas NM04/41257 y NM04/41258 se purificaron a partir de poblaciones seleccionadas con anterioridad con respecto a las otras cepas de la Tabla. Estos datos muestran que el protocolo repetitivo descrito en el presente documento da como resultado un aumento de la eficacia de la producción anaerobia de etanol mediante cepas no recombinantes.

Ejemplo 10

Producción rápida de etanol por *Saccharomyces* no recombinante inoculada a alta densidad en un medio mínimo en condiciones aerobias.

- 5 La cepa ISO 10 cultivada en agar con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica (como se ha descrito anteriormente) se inoculó en 50 ml de xilosa al 5% p/v, extracto de levadura al 0,5% y peptona bacteriológica al 1% p/v (XYP) contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se incubó durante 72 horas a 30 °C y a 220 rpm. Se incubaron veinte matraces simultáneamente.
- 10 Las células se recogieron por centrifugación a 3000 x g y a 22 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento de células se suspendió de nuevo en 10 ml de agua estéril antes de una nueva centrifugación. El sobrenadante se desechó otra vez y las células se suspendieron de nuevo en agua destilada estéril antes de una centrifugación adicional. Finalmente, las células se suspendieron de nuevo en 20 ml de agua destilada estéril.
- 15 El medio de fermentación, esterilizado por filtración se preparó de la siguiente manera: YNB que contenía base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos al 0,67%; XYNB que era YNB más xilosa al 5%; GXYNB era YNB más glucosa al 0,5% y xilosa al 4,5%. Los medios se incluyeron en matraces cónicos de vidrio de 125 ml. Se inocularon con 3 ml de suspensión celular y se colocaron en un agitador orbital a 220 rpm a 30 °C, y la lectura de la producción de etanol se realizó en intervalos de una hora, como se ha descrito anteriormente. Inmediatamente
- 20 después de la inoculación se midieron las densidades ópticas a 600 nm y se determinó que las densidades celulares en los cultivos estaban entre 5,7 y 6,1 x 10⁸ por ml.

Tabla 7. Producción de etanol mediante un inóculo de alta densidad de células de *Saccharomyces* no recombinante.

Medio	1h	2h	3h	4h	5h
YNB	0,41	0,44	0,36	0,29	0,09
XYNB	0,75	1,1	1,67	2,1	2,9
GXYNB	1,69	2,2	2,41	3,2	3,8

- 25 Los valores hacen referencia a g de etanol por litro en el sobrenadante del cultivo, en el tiempo indicado después de la inoculación. La pequeña cantidad de etanol producida por las células incubadas en YNB sin ninguna fuente de carbono procedía más probablemente a partir de la transmisión de azúcares de almacenamiento endógenos sintetizados y acumulados por la levadura durante las 72 horas de la fase de preparación del inóculo. La disminución de la concentración de etanol en los cultivos de YNB después de tres horas indica que los azúcares de almacenamiento se agotaron o iban a agotarse y que las células estaban consumiendo el etanol y/o que el etanol se evaporó.

- 35 Estos datos muestran que es posible obtener cepas de *Saccharomyces* no recombinante que puedan fermentar xilosa rápidamente para producir etanol en un medio mínimo donde la xilosa es la única fuente de carbono. Además, estas cepas son capaces de producir etanol a partir de xilosa en un medio donde también se añaden azúcares hexosas fermentables, tales como glucosa, dado que el etanol producido al cabo de 4 horas en GXYNB era superior a lo esperado solamente a partir de la glucosa presente.

Ejemplo 11

- 40 El crecimiento de biomasa de *Saccharomyces* no recombinante en xilosa como única fuente de carbono presenta amplias características útiles desde el punto de vista industrial

- 45 Los expertos en la materia conocerán que las levaduras han demostrado su utilidad industrial en diversas aplicaciones de fermentación (por ejemplo, producción de pan y de etanol (potable y no potable)) y también como fuente de aminoácidos y proteínas, nucleótidos, (por ejemplo ADN y ARN), enzimas (por ejemplo, invertasa y fitasa), antioxidantes (por ejemplo, glutatión) y otros componentes celulares tales como los componentes de la pared celular (por ejemplo, glucanos). Las propiedades mencionadas anteriormente son a modo de ejemplo y no pretenden ser limitantes.

- 50 Sería útil que las levaduras pudieran crecer en medios que contuvieran xilosa y después, posteriormente se usasen para los diversos propósitos industriales. Por lo tanto, a modo de ejemplo, la cepa ISO 10 se ensayó para determinar diversas características después de su crecimiento en xilosa.

- 55 La cepa ISO 10 se cultivó en un medio con los siguientes componentes por litro de agua destilada: 50 g de xilosa, 13,4 g de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos, complementada con 0,4 g de CuSO₄.5H₂O, 1 mg de ZnSO₄.7H₂O, 2 mg de MnSO₄.4H₂O, 1 mg de Na₂MoO₄.2H₂O, 1 mg de Na₂B₄O₇.10H₂O, 2 mg de pantotenato de calcio, 2 mg de hidrocloreto de tiamina, 2 mg de de piridoxina, 4 mg de inositol, 1 mg de ácido nicotínico, y 0,4 mg de biotina. Las células se agitaron a 1200 rpm con suministro de aire a 12 litros por minuto y a una temperatura de 30

°C y manteniendo el pH a 5 usando KOH 1M y ácido fosfórico 1M. Cuando la densidad celular fue de 14 en A_{600} , las células se recogieron por centrifugación a 3.000 x g y a 22 °C durante 10 minutos. El sedimento de células se suspendió de nuevo en agua destilada y se centrifugó otra vez. Este procedimiento de lavado se realizó tres veces y la biomasa se colocó en un papel de filtro Whatman N° 1 para conseguir una biomasa húmeda de sólidos del 22 al 25%.

La biomasa se evaluó para determinar las siguientes características, para demostrar que es posible cultivar *Saccharomyces* no recombinante en xilosa como única fuente de carbono para obtener biomasa de levadura con propiedades generalmente importante para las aplicaciones industriales.

Poder de fermentación etílica. La levadura se inoculó en un medio basado en melaza para ensayar el poder de fermentación etílica, definido como la capacidad para producir etanol a partir de azúcares fermentables tales como sacarosa, glucosa y fructosa. La melaza de la caña de se diluyó en agua y se esterilizó por calentamiento a 121 °C durante 5 minutos. Tras enfriarla a 22 °C, la melaza se centrifugó a 4.000 x g a 22 °C durante 10 minutos para eliminar los sólidos. El sobrenadante se diluyó hasta una concentración final de equivalentes de sacarosa al 18% p/p y se complementó con Base Nitrogenada de Levadura Difco al 0,67% p/v esterilizada por filtración. Se inocularon 40 ml de este medio con un equivalente de 6,8 mg de materia de levadura seca y se incubó a 30 °C sin agitación. El etanol se evaluó a intervalos de 24 h usando un analizador bioquímico YSI 2700 Select equipado con una membrana YSI 2786 para la detección de etanol (YSI Inc. Yellow Springs, Ohio, USA). Después de 24 h la levadura produjo 16,8 g de etanol por litro, y después de una semana la levadura había producido 59 g de etanol por litro.

Fermentación de masa de pan. Para ensayar el poder de fermentación, definido como la capacidad para fermentar azúcares tales como glucosa, fructosa y maltosa y de ese modo producir dióxido de carbono que levanta la masa de la harina, la levadura se añadió a una mezcla de masa de pan y se ensayó su capacidad para producir pan fermentado. Se preparó una masa que contenía 500 g de una mezcla de harina integral de soja y pan de linaza (Kitchen Collection, Christchurch), 300 ml de agua corriente y 10 g de levadura (a un 24% de sólidos). La masa se fermentó y se horneó usando un horno Breville Bakers en la posición 3B (HWI Electrical, Sydney Australia). La levadura levantó (fermentó) la mezcla de la masa para producir una hogaza de pan con una altura de 14 cm.

Contenido en glucano. Se extrajo una cantidad de biomasa de levadura equivalente a 59 mg de materia seca para determinar glucanos de acuerdo con el método descrito por Sutherland IW, y Wilkinson JF (1971) "Chemical Extraction Methods of Microbial Cells", en Methods en Microbiology Vol 5B (Eds. JR Norris and DW Ribbons), Capítulo IV págs. 345-383, Academic Press London and Nueva York. De acuerdo con Sutherland et al. este método produce "glucanos de la pared celular que carecen de material contaminante". Usando el método descrito se obtuvo una cantidad de 8 mg de glucano a partir de la levadura seca como material de partida.

Contenido en aminoácidos/proteínas. En un tubo de ensayo de vidrio en 2,5 ml de NaOH 1M, se suspendió una cantidad de material de levadura equivalente a 24,6 mg de materia seca de levadura y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. La muestra hervida se enfrió a 22 °C y se preparó un volumen de 10 ml usando agua destilada. Los ensayos de aminoácidos/proteínas se realizaron de acuerdo con Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, y Randall RJ (1951) Journal of Biological Chemistry 193:265-275, usando una albúmina de suero bovino convencional. Este ensayo indicó que la levadura contenía un equivalente del 39% en peso de materia seca de material de aminoácidos/proteínas.

Contenido en nucleótidos. En 1 ml de NaCl al 4% p/v se suspendió nuevamente una cantidad de material de levadura equivalente a 6,82 mg de materia seca y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Después de enfriarse a 22 °C la suspensión de levadura se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 22 °C y el sobrenadante se ensayó para determinar el contenido en nucleótidos mediante el método de absorbancia espectrofotométrica UV descrito por Herbert D, Phipps PJ, y Strange RE (1971) "Chemical Analysis of Microbial Cells", en Methods en Microbiology Vol 5B (Eds. JR Norris and DW Ribbons), Capítulo III págs. 209-344, Academic Press London and New York. La levadura contenía un 1,9 % en peso de materia seca de material nucleótido.

Contenido en glutatión. En 0,8 ml de etanol:agua destilada 80:20, se suspendió nuevamente una cantidad de material de levadura equivalente a 6,82 mg de materia seca, se mezcló con agitación vorticial y se centrifugó a 10.000 x g durante 2 minutos a 22 °C. El sobrenadante se ensayó de la siguiente manera: el tampón fosfato contenía 3,99 g de Na_2HPO_4 , 0,43 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,59 g de EDTA disódico dihidratado en 250 ml a pH 7,5. La solución de NADPH contenía 26,6 mg de sal tetrasódica de NADPH en 100 ml de tampón fosfato. El ácido 5,5"-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) se preparó pesando 23,8 mg de DTNB en 10 ml de tampón fosfato. El glutatión convencional se preparó en agua destilada hasta una concentración de reserva de 0,1 mM. La solución madre reductasa de Fluka Chemie AG contenía 162,72 unidades de actividad por ml.

El ensayo se realizó en una cubeta espectrofotométrica de 3 ml que contenía 1,4 ml de solución de NADPH + 200 microlitros de solución DTNB + 10 microlitros de muestra, solución convencional GSH o agua destilada y 390 microlitros de agua destilada. La muestra se precalentó a 30 °C y la reacción comenzó con la adición de 3 microlitros de glutatión reductasa. Las cubetas se incubaron a 30 °C durante 30 minutos y después se leyó la absorbancia contra el blanco de agua destilada a una longitud de onda de 412 nm usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-

1201. Este ensayo indicó que la levadura contenía el 0,36% en peso de materia seca de glutatión total.

5 *Actividad fitasa.* En 0,5 ml de tampón de acetato sódico 0,2M a pH 4,9 se suspendió nuevamente una cantidad de material de levadura equivalente a 13,5 mg de materia seca. El sustrato de fosfatasa de Sigma-Aldrich Chemie GMBH se preparó a 1 mg por ml en tampón de acetato sódico 0,2M a pH 4,9, y la enzima fitasa de Sigma-Aldrich Chemie GMBH (definida por el proveedor con 1,1 unidades de actividad fitasa por mg de material sólido) se preparó a 0,909 unidades por ml en tampón de acetato sódico 0,2M a pH 4,9. El ensayo se realizó en una cubeta que contenía 500 microlitros de tampón de acetato sódico + 250 microlitros de solución de sustrato de fosfatasa y 250 microlitros de cualquiera de una suspensión de levadura, la enzima fitasa o agua destilada. Las cubetas se
10 incubaron durante 20 minutos a 30 °C y transcurrido el tiempo se añadieron 300 microlitros de NaOH 10M. Se leyó la absorbancia a 405 nm contra el blanco de agua destilada. La actividad fitasa de la levadura fue de 0,068 unidades por mg de materia seca de levadura.

15 *Actividad invertasa.* En 1 ml de agua destilada se suspendió nuevamente una cantidad de material de levadura equivalente a 14,48 mg de materia seca. La suspensión se diluyó adicionalmente un céntuplo en agua destilada. La actividad invertasa se ensayó de acuerdo con el método colorimétrico descrito en el Ensayo T3 de la Patente de Estados Unidos 4.396.632 y la Patente de Estados Unidos 5.741.695. La levadura produjo 0,93 unidades de actividad invertasa, en la que una unidad de actividad se define como 1 micromol de glucosa liberado a partir de sacarosa por minuto a 30 °C y a un pH de 4,9 por mg de levadura seca.

20 Estos datos indican el potencial de *Saccharomyces cerevisiae* para crecer en xilosa como única fuente de carbono para producir componentes de biomasa, del metabolismo y celulares, , y/o actividades enzimáticas que son importantes para diversos tipos de aplicaciones industriales. Los expertos en la materia conocerán que los niveles o cantidades exactos de estas características se pueden manipular no sólo mediante métodos genéticos
25 recombinantes y clásicos, sino también a través de medios para modificar las condiciones de cultivo, de modo que los resultados expuestos anteriormente son meramente indicativos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El método para producir uno o más cepas de *Saccharomyces* que sean capaces de crecer con una tasa de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento, comprendiendo el método las etapas de:
- 10 (a) proporcionar una población genéticamente diversa de células de levadura de *Saccharomyces* no recombinantes;
- (b) cultivar las células de levadura en condiciones que permitan la combinación de ADN entre las células de levadura usando métodos no recombinantes;
- 15 (c) identificar o seleccionar las células de levadura incubando las células de levadura en o sobre un medio que contenga xilosa, en el que las células identificadas o seleccionadas formen la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante; y
- (d) repetir las etapas (b) y (c) con las células de levadura identificadas o ensayadas hasta obtener una o más células de levadura una con una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, que comprende la etapa adicional de aislar a una o más células de levadura con una tasa de crecimiento de al menos una generación cada 48 horas usando la xilosa como única fuente de carbono.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las células de levadura se incuban sobre un medio que contenga xilosa.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio que contenga xilosa contiene xilosa como única fuente de carbono.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células de levadura se seleccionan incubando las células de levadura sobre un medio que contenga xilosa.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio que contiene xilosa sea un medio mínimo de xilosa.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio que contiene xilosa es un medio mínimo sólido que contenga xilosa.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células de levadura se incuban en o sobre un medio que contenga xilosa durante un periodo de tiempo suficiente para permitir crecer en xilosa a las células de levadura que no tengan una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono.
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la combinación de ADN entre las células de levadura sea por cruzamiento.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, en el que el cruzamiento sea por esporulación de las células de levadura y por hibridación de la descendencia sexualmente competente.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la población genéticamente diversa de células de levadura comprende la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
- 50 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la población de células de levadura comprende cepas de *Saccharomyces* de origen natural.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la población genéticamente diversa de células de levadura no recombinante comprende cepas de *Saccharomyces* generadas por una o más de mutagénesis química o física, fusión de protoplasto, esporulación e hibridación, citoducción.
- 55 14. Una cepa aislada de *Saccharomyces* no recombinante seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Saccharomyces* depositada con el número de acceso del depósito AGAL NM04/41257, una cepa de *Saccharomyces* no recombinante depositada con el número de acceso del depósito AGAL NM04/41258, una cepa de *Saccharomyces* no recombinante depositada con el número de acceso del depósito AGAL NM05/45177, una cepa de *Saccharomyces* no recombinante depositada con el número de acceso del depósito AGAL NM05/45178.
- 60 15. El uso de la cepa de *Saccharomyces* de la reivindicación 14 en la producción de biomasa de levadura.
16. El uso de la cepa de *Saccharomyces* de la reivindicación 14 en la producción de etanol.
- 65 17. Un método para convertir xilosa en biomasa de levadura, que comprende el cultivo de una cepa de *Saccharomyces* de la reivindicación 14, con un medio que contenga xilosa en condiciones que permitan a la cepa

crecer usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.

5 **18.** Un método para producir biomasa de levadura que comprende el crecimiento de una cepa de *Saccharomyces* de la reivindicación 14, sobre o en un medio que contenga xilosa en el que al menos una parte de la biomasa de levadura se produce usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento.

10 **19.** Un método para producir un compuesto seleccionado del grupo que consiste en etanol, xilitol, ácido acético, enzimas, vitaminas, aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ADN, ADN, componentes de la pared celular, glucanos, manoproteínas, lípidos, esteroides, hidratos de carbono, ácido láctico, glicerol, ácido succínico, glucógeno, trehalosa y polioles, a partir de una cepa de *Saccharomyces*, comprendiendo el procedimiento el cultivo de la cepa de *Saccharomyces* de la reivindicación 14, en un medio que contenga xilosa en condiciones que permitan la producción del compuesto; y la recuperación del compuesto producido por la cepa.

15 **20.** Un método para producir etanol que comprende las etapas de:

- (a) incubar la cepa de la reivindicación 14, en un medio en condiciones que permitan la producción de etanol;
- (b) aislar el etanol producido.

20 **21.** El método de la reivindicación 20, en el que el medio es un medio que contiene xilosa y preferentemente en el que el medio que contiene xilosa comprende, además de xilosa, uno o más azúcares seleccionados del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, sacarosa, melibiosa, rafinosa, xilosa, melicitosa, alfa-metil glucósido, trehalosa y/o isomaltosa.

25 **22.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, en el que las cepas se incuban en condiciones anaerobias.

23. Un método para la producción de etanol que comprende:

- 30 (a) inocular los medios que contienen xilosa con la cepa de la reivindicación 14, a una densidad de al menos 1×10^8 levaduras por ml de medio;
- (b) incubar los medios inoculados durante un tiempo suficiente que permita la producción de etanol;
- (c) recuperar el etanol.

35 **24.** El método de la reivindicación 23, en el que la densidad es de al menos 5×10^8 por ml.

25. Un método para marcar una cepa de *Saccharomyces* deseada mediante el cual la cepa marcada presente al menos un incremento de 2 veces en su biomasa en el Ensayo T1, que comprende:

- 40 (a) cultivar la cepa deseada con una cepa de la reivindicación 14 en condiciones que permitan la combinación de ADN de las cepas;
- (b) identificar o seleccionar las células de levadura para obtener un derivado de la cepa deseada que tenga una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono para su crecimiento;
- 45 (c) aislar derivados de la cepa deseada de *Saccharomyces* que tiene una tasa de crecimiento aumentada usando la xilosa como única fuente de carbono,

en el que el Ensayo T1 tiene las siguientes etapas:

50 Etapa 1, cultivo de levadura durante 72 horas a 30 °C en un medio de Glucosa, Extracto de Levadura, Peptona Bacteriológica, solidificado con agar al 2%;

Etapa 2, inocular 50 ml de caldo con la levadura de la etapa 1 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml a una Densidad Óptica a 600nm (DO_{600}) de 0,1 a 0,2 unidades (DO_{600} a T_0), consistiendo el caldo en xilosa al 5% p/v y Base Nitrogenada de Levadura Difco sin aminoácidos al 0,67% en agua destilada;

55 Etapa 3, incubar el matraz Erlenmeyer a 30 °C agitando a 220 rpm; con un diámetro orbital de 10 cm. m;

Etapa 4, medir la DO_{600} después de 48 horas de incubación en la etapa 3 (DO_{600} a T_{48hrs});

60 Etapa 5, calcular el aumento de biomasa usando la fórmula DO_{600} a T_{48hrs} / DO_{600} a T_{0hrs} .

FIGURA 1

