

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 784**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/04** (2006.01)

**C12N 9/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2011 PCT/EP2011/071616**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2011 E 11794083 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2646544**

54 Título: **Procedimiento de preparación de una levadura industrial, levadura industrial y aplicación a la producción de etanol a partir de al menos una pentosa**

30 Prioridad:

**03.12.2010 FR 1004709**

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

**17.04.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DESFOUGERES, THOMAS y  
PIGNEDE, GEORGES**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 608 784 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

Procedimiento de preparación de una levadura industrial, levadura industrial y aplicación a la producción de etanol a partir de al menos una pentosa

**Campo técnico**

- 5 La presente exposición se refiere al campo de los procedimientos de obtención de cepas de levadura que producen etanol, levaduras así como productos, y de la producción industrial de etanol a partir de dichas levaduras. Más específicamente la presente exposición se refiere en su aspecto más general, a un procedimiento de preparación de levaduras a partir de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* llamadas industriales, dichas levaduras y su aplicación a la producción industrial de etanol a partir de los medios industriales que contienen al menos una pentosa, tal como la xilosa.

**Estado de la técnica**

El punto común a la mayor parte de los enfoques de la técnica anterior del campo consiste en procedimientos para la mejora de las cepas en patrimonio genético conocido y/o construido y cuyas capacidades para producir etanol se estudian en general en entornos y en condiciones "ideales" de laboratorio.

- 15 De hecho, la bibliografía científica así como los documentos de patente analizados por el solicitante enseñan, muy a menudo, procedimientos de obtención de cepas haploides o diploides, débilmente tolerantes al estrés sobre todo a altas concentraciones de etanol y/o a temperaturas elevadas y/o a los inhibidores fermentación. Además, estos métodos necesitan en su mayor parte tener recursos, para estas cepas, con utilización de de auxotrofia y/o marcadores de resistencia a los antibióticos que pueden descalificarlos para una utilización posterior en un entorno industrial por razones obvias de , o sea a veces de salud o ambientales.

Las propiedades de crecimiento de cepas desarrolladas anteriormente son generalmente insuficientes y estas cepas no se han enfrentado nunca a los imperativos de producción de biomasa a escala industrial, es decir, por mencionar sólo tres: fuerte tasa de crecimiento, capacidad de secado, estabilidad de conservación.

- 25 Los llamados rendimientos de fermentación (capacidad de producción anaerobia del etanol) se obtienen en medios sintéticos o denominados de laboratorio con estas cepas anteriores, no pueden transponerse en general, en entornos industriales que comportan mezclas complejas derivadas por ejemplo de residuos de tratamiento de celulosa que contienen compuestos tóxicos capaces de inhibir a diferentes niveles la maquinaria celular de la levadura, principalmente furfural, HMF, derivados fenólicos, ácido acético. Además, la capacidad de "scale up" o transposición de escala de estos procedimientos anteriores de producción de etanol rara vez se documenta.

- 30 El documento WO 2008/133665 da a conocer la producción de alcohol a partir de una cepa de levadura en el "contexto genético" de tipo:

- Gen STP15 mutado (F117S, Y195H, K218R).
- Genes que codifican los exógenos XI/XR/XDH o XK.

- 35 "XI" designa la xilosa isomerasa, "XR" designa la xilosa reductasa, "XDH" designa la xilitol deshidrogenasa y "XK" designa la D-xilulocinasa.

El documento WO 2005/113774 da a conocer un operón recombinado que comprende dos secuencias de ácido nucleico que codifican, respectivamente una XI de *E. coli* y XDH de *Trichoderma reesei* en el marco de la producción de xilitol.

- 40 En el documento Plos Genetics de Gavin Sherlock *et al.*, publicado el 13 de mayo de 2010, describe un gen *XDH1* presente en algunas cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae*, que posiblemente codifican una xilitol deshidrogenasa.

El documento a nombre de Dawid Brat, Eckhard Boles y Beate Wiedemann en *Appl. Environ. Microbiol.*, abril de 2009, vol. 75, n° 8, pág. 2304- 2311, describe la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* del gen de la xilosa isomerasa proveniente de *Clostridium phytofermentans*.

- 45 Se desprende de este examen de documentos de la técnica anterior, así como de los trabajos de los inventores de la presente invención, dado que los contextos/patrimonios genéticos muy diferentes de las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas con el fin de crecer en la xilosa y/o fermentarla, las consecuencias, por ejemplo, de una sobreexpresión y/o de una supresión de genes naturales y/o la introducción de uno o de varios genes heterólogos no se pueden predecir.

## Resumen de la invención

Además, el solicitante estudiando numerosas cepas de tipo alcohol, cerveceras y de panadería, ha constatado de manera sorprendente que la introducción en cepas de levadura de casetes de expresión o de supresión determinadas a fin de expresar en ellas a ruta metabólica XI-XDH, les hacía particularmente eficaces en la producción de etanol. Aún más, el solicitante ha constatado que la introducción del ácido nucleico que codifica XI no es suficiente por sí sola para la fermentación eficiente de la xilosa.

En general, el solicitante ha constatado que la introducción de casetes de expresión de un gen que codifica una enzima capaz de convertir cualquier hidrato de carbono (principalmente D-xilosa) en xilulosa (D-xilulosa) y de un gen que codifica una enzima capaz de convertir cualquier pentol (especialmente xilitol) en xilulosa en una sola etapa, hacía a todas las cepas así modificadas particularmente eficaces en el crecimiento y/o la fermentación de la xilosa.

Por "enzima capaz de convertir la xilosa en xilulosa" se entiende una enzima xilosa isomerasa.

Por "enzima capaz de convertir en una sola etapa el xilitol en xilulosa" se entiende una enzima xilitol deshidrogenasa.

De hecho, el solicitante ha confirmado que contrariamente a la vía llamada fúngica que relaciona XR y XDH, dicha vía bacteriana de isomerización (uno de cuyos ejemplos es el de *C. phytofermentans*), cuando se aplica, no implica cosustratos. Además, esta vía permite evitar la acumulación de xilitol, que es un intermedio metabólico presente en la vía fúngica y puede reducir de manera significativa el rendimiento de la producción de etanol.

Muy recientemente, en algunas cepas de *S. cerevisiae*, principalmente las utilizadas en la elaboración del vino, ha sido identificado un gen *XDH1* como esencial para el metabolismo de la xilosa de dichas cepas (PLoS Genetics 2010, 6, 1-17). Además, el solicitante ha constatado que, incluso suprimiendo el gen *GRE3* de las cepas modificadas de genes, hay otras actividades parásitas que pueden convertir la xilosa en xilitol (actividad de aldosa reductasa). Lo que es perjudicial para la actividad XI reduciendo así el rendimiento del etanol buscado.

Los trabajos realizados por el solicitante muestran que el fortalecimiento de los resultados de la actividad xilitol deshidrogenasa se traduce en la ausencia de inhibición de la XI y por lo tanto en la estimulación de esta vía. Lo que permite la producción de etanol a partir de un medio que comprende al menos xilosa, con un buen rendimiento cinético.

En otras palabras, en el estado de la técnica, se han explorado dos vías diferentes para permitir la fermentación de la xilosa por la levadura: la vía llamada fúngica que utiliza las enzimas XR y XDH; y la vía llamada bacteriana que utiliza la enzima XI. El objeto de la presente exposición combina de una manera original enzimas procedentes de estas dos vías con el fin de obtener un mejor resultado.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere en particular a una cepa de levadura que comprende al menos una copia de un gen exógeno que codifica una xilosa isomerasa, y una copia de un gen exógeno que codifica una xilitol deshidrogenasa.

Por gen "exógeno" (en contraposición a "endógeno") se entiende un gen que no está presente de forma natural en la especie de levadura considerada. El gen que codifica una xilitol deshidrogenasa puede ser el gen *XYL2*, pero en este caso se trata del gen *XYL2* de otra especie distinta de la cepa considerada.

La exposición también se refiere a un procedimiento de preparación una cepa de levadura que comprende al menos una copia de un gen exógeno que codifica una xilosa isomerasa, y una copia de un gen exógeno que codifica una xilitol deshidrogenasa.

La exposición también se refiere a un procedimiento de producción de etanol que utiliza las cepas de levadura según la invención.

## Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 ilustra un vector de sobreexpresión de la XDH de *Pichia stipitis*.
- La figura 2 ilustra un vector de sobreexpresión de la XI de *Clostridium phytofermentans*.
- La figura 3 es un gráfico que ilustra la producción de etanol como una función del tiempo de fermentación a 32°C de dos cepas de levadura según la invención después de la evolución dirigida y de la cepa etanol red™. Los clones ensayados han sido inoculados a razón de 5 g de masa seca/l en un medio YF + xilosa a 70 g/l.
- La figura 4 es un gráfico que ilustra la producción de etanol en función del tiempo de fermentación a 32°C de dos de levadura, uno según la invención después de la evolución dirigida, la otra cepa derivada de la primera pero después de la sustitución de la copia del gen XDH con un marcador de resistencia a la kanamicina

(KanMX4). Los clones ensayados se han inoculado a razón de 5 g de masa seca/l en un medio YF + xilosa 70 g/l.

- 5 - La Figura 5 es un gráfico que ilustra la producción de etanol (en ordenadas, en g por 1 kg de medio) en función del tiempo de fermentación a 32°C (en abscisas, en horas) de dos cepas de levadura según la invención, EG8 y EG10. Los clones ensayados se inocularon a razón de 0,25 g de levadura seca por kg de medio YF que contiene xilosa a 70 g/l como la única fuente de carbono.

### Descripción detallada de las realizaciones

Por lo tanto, la presente exposición tiene por primer objeto un procedimiento de preparación de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* capaz de producir etanol a partir de un medio que comprende al menos una pentosa (principalmente la xilosa) y que comprende las etapas siguientes consistentes en

- (i) seleccionar (o proporcionar) una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*
- (ii) integrar los siguientes casetes de expresión en el genoma de la levadura de la etapa (i),
- a. la asociación del tipo marco abierto de lectura (ORF) de un gen que codifica una enzima capaz de convertir cualquier hidrato de carbono, principalmente xilosa, en xilulosa bajo el control de un activador y de un terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, estando dicho casete flanqueado aguas arriba y aguas abajo de las regiones recombinógenas que permiten su integración dirigida en el genoma,
- 15 b. la asociación del tipo marco abierto de lectura (ORF) de un gen que codifica una enzima capaz de convertir en una sola etapa cualquier pentol, principalmente xilitol, en xilulosa bajo el control de un activador y de un terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, estando dicho casete flanqueado aguas arriba y aguas abajo de las regiones recombinógenas que permiten su integración dirigida en el genoma,
- 20 (iii) inducir la expresión de al menos un gen de cada etapa de la parte no oxidativa la vía de las pentosas fosfato así como al menos un gen que codifica la xilulocinasa (XKS1), colocándolos bajo el control de un activador de un gen, principalmente de la glucólisis, sin control ni por anaerobiosis ni por represión catabólica y altamente expresado durante la fermentación alcohólica, y
- 25 (iv) suprimir al menos una copia o preferiblemente al menos dos copias del marco abierto de lectura (ORF) del gen de *Saccharomyces cerevisiae* *GRE3* que codifica una aldosa reductasa. Preferentemente se eliminan todas las copias del marco abierto de lectura (ORF) del gen de *Saccharomyces cerevisiae* *GRE3*.

El gen *XKS1* es preferiblemente el gen que aparece en GenBank con el número 853108.

El gen *GRE3* es preferiblemente el gen que aparece en GenBank con el número 856 504.

- 30 Preferiblemente, el gen de la etapa (ii)a es un gen XI que codifica la enzima xilosa isomerasa seleccionada entre las presentes en los genomas de *Clostridium*, *Pyromyces*, *Bacteroides*, *Streptomyces*, *Haemophilus*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Thermotoga*, *Fusobacterium*, *Geobacillus*, *Arthrobacter*, *Ciona*, *Physcomitrella*, *Cellvibrio*, *Chitinophaga*, *Saccharopolyspora* o *Salinibacter*.

- 35 El XI se selecciona preferiblemente entre un gen de *Clostridium phytofermentans*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Salinibacter ruber* o *Piromyces* sp. E2.

- Según una realización preferida, el gen XI tiene por secuencia la secuencia de nucleótidos SEQ ID n°: 1 (que representa la secuencia del gen XI de *Clostridium phytofermentans*, descrita en el documento DE 102008031350). Alternativamente, el gen XI tiene una secuencia que presenta al menos 70% de identidad, preferentemente al menos 75% de identidad, o al menos 80% de identidad, o al menos 85% de identidad, o al menos 90% identidad, o al menos 95% de identidad, o al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad, con la secuencia SEQ ID n°: 1, y codifica una enzima xilosa isomerasa funcional.

- 45 Según otra realización, el gen XI presenta una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID n°: 2 (que representa la secuencia de la proteína XI de *Clostridium phytofermentans*, descrita en el documento DE 102008031350). Alternativamente, dicho polipéptido tiene una secuencia que presenta al menos 70% de identidad, preferentemente al menos 75% de identidad, o al menos 80% de identidad, o al menos 85% de identidad, o al menos 90% identidad, o al menos 95% de identidad de, o al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad, con la secuencia SEQ ID n°: 2, y tiene una actividad xilosa isomerasa.

Según la presente invención por “transformar el xilitol en xilulosa en una sola etapa” se entiende una oxidación directa del xilitol a xilulosa y esto por una sola y la misma enzima (xilitol deshidrogenasa).

- 50 Preferiblemente, el gen de la etapa (ii)b, es un gen de *Pichia stipitis* que codifica la enzima xilitol deshidrogenasa XDH.

Preferentemente, se trata del gen *XYL2*, cuya secuencia figura en GenBank con el número 4.852.013, o una secuencia que presenta al menos 70% de identidad de, preferentemente al menos 75% de identidad, o al menos 80% de identidad, o al menos 85% de identidad, o al menos 90% de identidad, o al menos 95% de identidad, o al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad, con respecto a dicha secuencia que figura en GenBank con el número 4.852.013, codificando la secuencia una enzima xilitol deshidrogenasa funcional.

Preferentemente, la cepa de levadura de la etapa (i) presenta una actividad xilitol deshidrogenasa XDH endógena inferior a 150 mKat/g de proteínas. La actividad xilitol deshidrogenasa puede medirse en las condiciones indicadas en el artículo de Xu *et al.*, titulado *Characterization of Ethanol Production from Xylose and Xylitol by a Cell-Free Pachysolen tannophilus System* en *Appl. Environ. Microbiol.* 59:231 -235 (1993).

Es sabido que, durante el tratamiento de la biomasa destinada a la fermentación alcohólica, aparecen algunos inhibidores de fermentación. Entre ellos se pueden citar los productos fenólicos, el furfural o incluso el ácido acético. También es sabido que estos inhibidores son perjudiciales para los rendimientos, incluso la supervivencia de la levadura.

Para resolver este problema adicional, el solicitante propone seleccionar la cepa de la etapa i entre las cepas industriales que presentan resistencia a los derivados fenólicos.

Otra ventaja de la vía XI es la posibilidad de "injetar en paralelo la vía arabinosa bacteriana" como se describe por ejemplo en EP 1.499.708 o aún en el documento WO 2008/041840, permitiendo esta combinación a continuación aumentar el grado de alcohol final en caso de presencia de arabinosa en los medios a fermentar.

El procedimiento de preparación de la levadura de la presente invención tiene en cuenta tanto las limitaciones del productor de levadura como al mismo tiempo de las de un usuario final en sus aplicaciones principalmente en términos de producción industrial de etanol a bajo costo y alto rendimiento.

El método según la invención presenta, en particular, las siguientes ventajas:

Para el productor de levadura, permite:

- La construcción de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* aneuploide o poliploide, protótrofa para permitir la producción de biomasa en fuentes simples de carbono, nitrógeno, fósforo en los medios de bajo costo, tales como los subproductos de la industria azucarera como melaza por ejemplo,
- disponer de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que presenta una tasa máxima de crecimiento ( $\mu$  max) comprendida entre  $0,37 \text{ h}^{-1}$  y  $0,5 \text{ h}^{-1}$ ,
- disponer de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que, cuando se produce según un procedimiento tal como se describe en el libro de referencia "Yeast Technology (2ª edición, 1991, G. Reed y T.W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8), permite obtener un rendimiento de producción de biomasa de al menos 45 g de materias secas de levadura por 100 g de equivalente de sacarosa aplicado,
- disponer de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* resistente a proceso de secado tal se describe en los documentos de patentes EP 511.108 y US 5.741.695, no debiendo exceder de 30% la pérdida de actividad fermentativa después del secado,
- la producción en condiciones industriales (especialmente medio poco costoso, buen rendimiento de biomasa, levadura seca lista para su uso) de una levadura fresca o seca, a partir de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente estable, robusta ya que especialmente tolerante a altas concentraciones de etanol y capaz de producir, a partir de por ejemplo biomasas semicelulósicas, etanol, a razón de al menos, 40 g/l y éste a una temperatura elevada de aproximadamente 30 a 40°C.

Una cepa de levadura protótrofa es una cepa capaz de crecer en un medio mínimo. En particular, una cepa de levadura protótrofa según la invención es capaz de sintetizar todos los aminoácidos y bases necesarios para su crecimiento.

Un medio mínimo es un medio que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de potasio, una fuente de fósforo, una fuente de azufre, una fuente de magnesio, una fuente de calcio, una fuente de hierro, una fuente de oligoelementos y agua.

Un ejemplo de medio mínimo es el medio YNB (Yeast Nitrogen Base). El medio YNB comprende por litro: 2 µg de biotina, 400 µg de pantotenato de calcio, 2 µg de ácido fólico, 2.000 µg de inositol, 400 µg de niacina, 200 µg de ácido p-aminobenzoico, 400 µg de hidrocloreuro de piridoxina, 200 µg de riboflavina, 400 µg de clorhidrato de tiamina, 500 µg de ácido bórico, 40 µg de sulfato de cobre, 100 µg de yoduro de potasio, 200 µg de cloruro férrico, 400 µg de sulfato de manganeso, 200 µg de molibdato de sodio, 400 µg de sulfato de cinc, 1 g de fosfato de potasio monobásico, 500 mg de sulfato de magnesio, 100 mg de cloruro de sodio, 100 mg de cloruro de calcio, 5 g/l de sulfato de amonio, pH final 5,4.

Según otra variante preferida del procedimiento según lo expuesto, cuando en la etapa (ii) la casete de expresión consiste en la asociación del tipo marco abierto de lectura (ORF) del gen XI que codifica la enzima xilosa isomerasa de *Clostridium phytofermentans* activador y terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo dicha casete flanqueada aguas arriba y aguas abajo de las regiones recombinógenas que permiten su integración dirigida en el genoma, dicho proceso comprende entonces además una etapa de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) en presencia de polímeros de hexosas, en su mayor parte constituidos por glucosa y al menos una enzima capaz de hidrolizarlos.

Además, para el productor de etanol, la ventaja del proceso según la invención es una vez más disponer de una levadura activa (fresca – líquida o comprimida, comprimida o seca), obtenida según un procedimiento de producción tal como se describe en la obra "Yeast Technology", a partir de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* tal como se define en el párrafo anterior que es:

- capaz, en las condiciones de SSF descritas en el documento de patente WO 2004/046333, de fermentar a 32°C un hidrolizado de cereales hasta una concentración de etanol de 16% (p/p) mínimo;
  - capaz, en las condiciones de SSF descritas en el documento de patente WO 2004/046333, de fermentar a 35°C un hidrolizado de cereales hasta una concentración en etanol de 14,5% (p/p) mínimo.
- 15 Los resultados del proceso según la invención son tanto más notables cuando se obtiene de una cepa llamada industrial, aneuploide o poliploide protótrofa y que tiene de hecho un material genético mucho más complejo que el de una cepa llamada de laboratorio, que hace por lo menos imprevisibles las consecuencias de las modificaciones de dicha cepa industrial. Este fondo genético complejo, específico para las cepas industriales hace tanto más difícil la obtención de cepas genéticamente modificadas al final de marcadores de resistencia a los antibióticos, sobre todo cuando hay que cambiar numerosas dianas genéticas. Las cepas exentas de marcadores con resistencia a antibióticos son obviamente por razones de salud y ambientales.

Las cepas protótrofas según la invención tienen la ventaja de crecer en fuentes simples de carbono, nitrógeno y fósforo.

Pero esta característica hace que los vectores de transformación disponibles en la comunidad científica (vectores que utilizan marcadores de auxotrofia) son inoperantes.

25 Es pues necesario tener disponibles herramientas/vectores utilizando marcadores de resistencia a los antibióticos, estando construidas convenientemente estas llamadas herramientas/marcadores para permitir al final la escisión de estos marcadores. A modo de ejemplo, se puede utilizar la tecnología Cre-lox. En resumen, se prevé secuencias loxP que encuadran cada marcador de selección. La escisión de los marcadores de selección se efectúa mediante la transformación de la cepa de levadura por el método de acetato de litio (Schiestl y Gietz, 1989, *Current Genetics*, vol. 16, págs. 339-346), con un plásmido que comprende el gen de la recombinasa Cre y un marcador de selección diferente o marcadores de selección a extirpar. La expresión de la recombinasa Cre en la cepa de levadura permite extirpar el marcador de selección, dejando sólo una secuencia loxP, opcionalmente con sus regiones flanqueantes. Es entonces posible inducir la pérdida del plásmido que comprende el gen Cre mediante el cultivo en condiciones no selectivas, es decir en medio enriquecido y en ausencia de antibiótico. La construcción de levaduras según la invención ha necesitado por ejemplo el empleo de 4 marcadores positivos diferentes que confieren resistencias a 5 antibióticos diferentes (geneticina, fleomicina, higromicina, blastidina y nourseotricina).

Las cepas según la invención son preferiblemente aneuploides o poliploides: es una característica generalmente encontrada en las levaduras industriales que vienen del medio natural. La historia filogenética de estas cepas es el origen de esta característica.

40 Pero es una dificultad adicional encontrada cuando se desea destruir/inactivar todas las copias de un gen dado. Sin embargo, este carácter de aneuploidía o poliploidía está por lo general en el origen de muchas de las propiedades de interés de las levaduras industriales (tasa de crecimiento, resistencia a varios tipos de estrés, estabilidad fenotípica).

Además, el solicitante después de largas investigaciones ha constatado con sorpresa que con el procedimiento según la invención, aplicado a partir de la cepa seleccionada:

- 45 - la introducción de casetes de expresión y de supresión no debilitaba de ninguna manera la levadura modificada que ve mejorada su herencia genética.

En particular, los inventores han demostrado que con dicha cepa es posible realizar:

- 50 - la supresión de al menos dos copias del gen *GRE3* de *S. cerevisiae* (siendo la enzima Gre3p una aldosa reductasa, que consume NADPH, H<sup>+</sup> que es producida en gran medida por la parte oxidativa de la vía de las pentosas) en dicha cepa industrial según la invención ha permitido reducir otro tanto el consumo de NADPH, H<sup>+</sup> por dicha enzima.

En la variante preferida, al menos dicho gen de cada etapa de la parte no oxidativa de la pentosa fosfato de la etapa (iii) se selecciona del grupo constituido por los genes que codifican las enzimas D-ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa, ribosa 5-fosfato cetol-isomerasa, transcetolasa y transaldolasa, y principalmente en el grupo constituido por los genes *RPE1*, *RK11*, *TKL1* y *TAL1*. Preferiblemente, dicho activador de un gen de la glucólisis muy expresado durante una fermentación alcohólica es el activador de *TDH3* para *RPE1*, *RK11* y *TKL1* y *PGK1* para *TAL1*.

El gen *TAL 1* gen es preferentemente el gen que aparece en el GenBank con el número 851.068.

El gen *TKL 1* es preferentemente el gen que aparece en GenBank con el número 856.188.

El gen *RK11* es preferentemente el gen que aparece en GenBank con el número 854.262.

El gen *RPE1* es preferentemente el gen que aparece en GenBank con el número 853.322.

10 Según características complementarias o alternativas, en el procedimiento de preparación de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* según la invención:

15 - El activador de *Saccharomyces cerevisiae* de las etapas (ii)(a) y (ii)(b) se selecciona en el grupo que comprende los activadores de genes que codifican enzimas de la glucólisis y los que codifican las enzimas alcohol deshidrogenasa y preferentemente se selecciona en el grupo constituido por *ADH1*, *ADH2*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* y *GAL1/10*, preferentemente *ADH1*. El terminador de *Saccharomyces cerevisiae* está constituido por *CYC1* o por el terminador propio del gen de la vía no oxidativa de las pentosas fosfato.

Está previsto preferentemente una etapa posterior de la evolución dirigida que comprende las siguientes etapas sucesivas que consisten en someter la levadura obtenida a

(i) una mutagenia,

20 (ii) un crecimiento en cultivos cíclicos bajo O<sub>2</sub> limitado en un medio que comprende al menos dicha pentosa, y

(iii) una selección por crecimiento aerobio en medio sólido que contiene glicerol como única fuente de carbono,

a fin de obtener mutantes sin insuficiencia respiratoria de dicha levadura que presentan crecimiento en condiciones anaerobias en presencia de un medio que comprende al menos dicha pentosa (principalmente xilosa).

25 Preferiblemente, en esta variante, la mutagenia de la etapa (i) se realiza en condiciones "suaves", es decir, mutagenia moderada con 100 a 500 J/cm<sup>2</sup> y, más preferentemente, 300 J/cm<sup>2</sup> de radiación UV a 254 nm. Estas condiciones no suponen más que una mortalidad del 7% al 16% de la población expuesta a la radiación UV.

30 Los inventores sorprendentemente han demostrado de este modo que con una mortalidad controlada tan baja, se reduce en un factor de 10 la duración de la etapa de evolución dirigida por cultivos cíclicos necesaria para la obtención de mutantes capaces de fermentar al menos dicha pentosa (especialmente xilosa). La tasa de supervivencia se determina sembrando en placas de medio, cuya fuente de carbono es la glucosa, un volumen idéntico de la suspensión de células antes y después de la mutagenia. El número de colonias se determina después de 48 horas de crecimiento.

Preferiblemente, la limitación de O<sub>2</sub> de la etapa (ii) de esta variante se realiza gracias a la sobrepresión parcial en el equipo utilizado (por ejemplo, matraces o fermentadores) debido a una sobrepresión consecutiva a la producción del CO<sub>2</sub> producido.

35 Los cultivos cíclicos según esta variante, en las condiciones de fermentación, utilizados permiten enriquecer la población en mutantes capaces de fermentar dicha pentosa (principalmente xilosa) y esto en un tiempo de 2 a 6 semanas y preferentemente de 3 a 4 semanas que es relativamente corto y muy interesante en comparación con lo que se habría obtenido por quimiostato como describen Kuyper *et al.* (2004), *FEMS Yeast Res.*, 4, 655-664.

40 Aunque el fenotipo con insuficiencia respiratoria "pequeño" pueda concordar con los criterios fermentación de al menos dicha una pentosa, en esta variante los presentes inventores han realizado una etapa de eliminación de levaduras "pequeñas ya que este fenotipo es incompatible con los procedimientos de producción de levaduras industriales en el sentido de la invención.

45 Los investigadores han constatado que la etapa en la evolución dirigida, tal como se explica anteriormente ha permitido aumentar de manera no despreciable la actividad de la xilosa isomerasa, lo que se ha traducido en un aumento de la velocidad de consumo de la xilosa.

Sin querer estar ligado por una teoría, este efecto inesperado se debe aparentemente al aumento del número de copias XI en la cepa modificada.

La presente invención además tiene por objeto la cepa EG6 de la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* obtenida directamente por el procedimiento según la invención después de la etapa de evolución dirigida y que consiste en la cepa de levadura presentada el 23 de noviembre de 2010 a la C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia) con el nº I-4399 en las condiciones del Tratado de Budapest.

La presente invención tiene igualmente por objeto la cepa EG7 de la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* directamente obtenida por el procedimiento según la invención después de la etapa de evolución dirigida presentada el 23 de noviembre de 2010 a la C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) con el nº I-4400 en las condiciones del Tratado de Budapest.

La presente invención tiene igualmente por objeto la cepa EG8 de la industrial *Saccharomyces cerevisiae* directamente obtenida por el procedimiento según la invención después de la etapa de evolución dirigida presentada el 14 de diciembre de 2010 a la C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) con el nº I-4417 en las condiciones del Tratado de Budapest.

La presente invención tiene igualmente por objeto la cepa EG10 de la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* directamente obtenida por el procedimiento según la invención después de la etapa de evolución dirigida presentada el 5 de octubre de 2011 en la C.N.C.M. (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) con el nº I-4538 N en las condiciones del Tratado de Budapest.

Otras cepas según la invención son cepas derivadas de una o más cepas de la invención, por ejemplo de una cepa o más cepas obtenidas según el procedimiento anterior, y principalmente de " una o más cepas presentadas en la C.N.C.M. con el número I-4399 el 23 de noviembre de 2010, con el número I-4400 el 23 de noviembre de 2010, con el número I-4417 el 14 de diciembre de 2010 y con el número I-4538 el 5 de octubre de 2011.

La expresión "cepa derivada", designa en especial las cepas derivadas por uno o o más crecimientos y/o por mutación y/o por transformación genética.

Las cepas derivadas por cruce pueden obtenerse cruzando una cepa según la invención con la misma cepa, u otra cepa según la invención, o cualquier otra cepa.

Las cepas derivadas por mutación puede ser cepas que hayan experimentado al menos una mutación espontánea en su genoma o al menos una mutación inducida por mutagenia. La mutación o mutaciones de cepas derivadas pueden ser imperceptibles o no.

El término "mutagenia" designa tanto la mutagenia aleatoria obtenida por aplicación de un rayo de luz (por ejemplo UV), o por agentes químicos mutágenos, y la mutagenia por inserción o dirigida, por transposición o por integración de un fragmento de ADN exógeno.

Las cepas derivadas dentro del marco de lo expuesto son los que comprenden al menos un gen XI exógeno y un gen XDH exógeno, y que son capaces de fermentar la xilosa para producir etanol, y principalmente con un rendimiento medio de etanol producido sobre la xilosa consumida superior o igual a 0,2 g, preferentemente 0,3 g, 0,35 g o sea 0,38 g de etanol por g de xilosa consumida.

Estas cepas derivadas presentan además preferentemente una supresión del gen *GRE3*, y/o un control de los genes *XKS1* y/o *RPE1* y/o *RK11* y/o *TKL1* y/o *TAL1* bajo el control de un activador de un gen no reprimido por anaerobiosis o por represión catabólica inducida por cualquier fuente de carbono, y muy expresado durante la fermentación alcohólica, tal como un activador de un gen que codifica una enzima de la glucólisis o que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa, preferentemente el activador de *ADH1*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* o *GAL1/10*.

Preferiblemente además:

- la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenida está práctica o completamente exenta de marcadores principalmente de resistencia a antibióticos.

Preferentemente, las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* preparadas conforme a la presente invención, según los criterios definidos anteriormente, conservan, después de la introducción de modificaciones genéticas y otras mutaciones generadas durante la etapa de evolución dirigida, sus características genotípicas y fenotípicas después de un proceso industrial completo de producción. En especial, s levaduras producidas presentan una cinética de producción de alcohol, una cinética de consumo de xilosa y/o arabinosa y una cantidad máxima de alcohol producido rigurosamente idénticas a la cepa de levadura antes de la aplicación de un proceso industrial completo.

Además, las características industriales de la cepa seleccionada antes de la manipulación tal como se describe anteriormente (tasa de crecimiento, rendimiento de producción, capacidad de secado) permanecen inalteradas.

La presente exposición tiene además por objeto un procedimiento de producción de etanol, a partir de un medio que comprende al menos una pentosa, por fermentación con ayuda de una levadura según la invención, mencionada anteriormente, y tal que se obtiene por un procedimiento según la invención como se acaba de describir.

5 Preferiblemente, el procedimiento de producción de etanol presenta las características alternativas y/o complementarias siguientes:

- Al menos dicha pentosa es la xilosa o una mezcla de xilosa y arabinosa.
- Dicho medio se selecciona del grupo constituido por, los hidrolizados de lignina, de celulosa, de hemicelulosa, de dextrinas o de almidón.
- 10 - En el caso de una solución salina fisiológica, las velocidades medias de liberación de hexosas, principalmente de glucosa, son del orden de 2,8 a 5,6 g/l/h con una concentración extracelular en hexosa, principalmente glucosa, cero.
- El rendimiento medio de etanol producto sobre la xilosa consumida es superior o igual a 0,38 g de etanol por g de xilosa consumida, por ejemplo, puede ser aproximadamente de 0,40 g de etanol por g de xilosa consumida.

15 Las concentraciones de azúcares que pueden aplicarse (por ejemplo, 70 g/kg de xilosa o 150 g/kg de xilosa) están en conocimiento del solicitante, las concentraciones máximas que pueden encontrarse en la práctica. Todos los ensayos publicados que se refieren a la fermentación de la xilosa se han realizado con concentraciones significativamente inferiores en azúcares totales.

20 Otras características y ventajas de la invención llegarán a ser aún mejor en la lectura de los ejemplos de realización que siguen que se dan a título puramente ilustrativo y no exhaustivo, y para la comprensión de los cuales se hace referencia a los dibujos adjuntos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

La selección de la cepa es tal como se describe en la descripción anterior.

25 Todas las secuencias de ADN que se han utilizado para las diferentes transformaciones destinadas a la sobreexpresión de un gen se han obtenido a partir de un vector típico (tipo pUC) en el que se han rechazado:

- las dianas de integración;
- los activadores/terminadores seleccionados por gen de interés y
- los marcadores de resistencia serán eliminados después (véase más adelante).

Un ejemplo de vector utilizado para la sobreexpresión de la XDH de *Pichia stipitis* se ilustra en la figura 1.

30 Un ejemplo de vector utilizado para la sobreexpresión de la XI de *Clostridium phytofermentans* se ilustra en la figura 2.

Para la interrupción de copias del gen *GRE3* de la cepa industrial seleccionada, los inventores han utilizado amplificadores PCR a partir de un plásmido de tipo pUG6 (Güldener U., Heck S., Fielder T., Beinhauer J., Hegemann J.H. *Nucleic Acids Res.* 1 Jul. 1996; 24(13):2519-24).

35 La etapa de transformación de la levadura se llevó a cabo según Gietz, R.D. y R.A. Woods. (2002) TRANSFORMATION OF YEAST BY THE Liac/SS CARRIER DNA/PEG METHOD. *Methods in Enzymology* 350: 87-96.

Las cepas de levadura según la invención, respectivamente EG6, EG7, EG8 y EG10 se han depositado en la CNCM y se les han atribuido los números I-4399, I-4400, I-4417 e I-4538, respectivamente.

Las cepas según la invención:

- poseen el genotipo siguiente:
- 40 *Etanol Red*<sup>™</sup>, *Delta GRE3*, *BUD5::pADH1-XKS1-tCYC1*, *TAL1::pPGK1-TAL1-tCYC1*, *TKL1::pTDH3- TKL1-tCYC1*, *RPE1::pTDH3-RPE1-tCYC1*, *RKI1::pTDH3-RKI1-tCYC1*, *HO::PsXYL2-HYGRO*, *BUD5::CpXI-BLAST*
- Están desprovistos de cualquier marcador residual. (por acción de la recombinasa Cre).

Ejemplo 2

La mutagenia de las cepas obtenidas en el ejemplo anterior se ha realizado moderadamente a saber, de 100 a 500J/cm<sup>2</sup> y preferentemente a 300 J/cm<sup>2</sup> de ultravioleta a 254 nm.

Después de una semana de cultivo a 32°C en un medio de tipo YE (Extracto de levadura al 0,5%) que contiene 7% de xilosa en agitación, sin aireación - realizándose la limitación de O<sub>2</sub> gracias a una supresión parcial en los matraces debido al CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación - se utiliza un ml del cultivo para volver a sembrar el mismo medio. Esta operación se repite 6 veces. Las células se diseminan finalmente en el medio de agar-agar YE Glucosa a 20 g/l. Las colonias aisladas se seleccionan y se cultivan sucesivamente en:

- 10 - YE Glicerol a 20 g/l y en aerobiosis para eliminar los mutantes "pequeños" es decir, con insuficiencia respiratoria;
- YE Glucosa para comprobar su velocidad de crecimiento;
- YE Xilosa para identificar los clones más interesantes.

Ejemplo 3

Después de obtener la cepa EG6, la copia del gen XDH que se ha añadido en el ejemplo 1 se ha sustituido por el gen de resistencia a la kanamicina. La nueva cepa obtenida se denomina EG6 - XDH. La capacidad de la cepa en cuestión para fermentar la xilosa se ha comparado con la de la cepa EG6. El resultado de esta comparación se muestra en la figura 4.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Lesaffre et Compagnie
- 20 <120> Procedimiento de preparación de una levadura industrial, levadura industrial y aplicación a la producción de etanol a partir de al menos una pentosa
- <130> 3873-02101
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
- <211> 1317
- <212> ADN
- <213> Clostridium phytofermentans
- <400> 1

ES 2 608 784 T3

atgaaaaatt	actttccaaa	tgttccagaa	gtaaaatacg	aaggcccaaa	ttcaacgaat	60
ccatttgctt	ttaaataatta	tgacgcaaat	aaagttgtag	cgggtaaaac	aatgaaagag	120
cactgtcgtt	ttgcattatc	ttggtggcat	actctttgtg	caggtggtgc	tgatccattc	180
ggtgtaacaa	ctatggatag	aacctacgga	aatatcacag	atccaatgga	acttgctaag	240
gcaaaagttg	acgctggttt	cgaattaatg	actaaattag	gaattgaatt	cttctgtttc	300
catgacgcag	atattgctcc	agaaggtgat	acttttgaag	agtcaaagaa	gaatcttttt	360
gaaatcgttg	attacatcaa	agagaagatg	gatcagactg	gtatcaagtt	attatggggg	420
actgctaata	actttagtca	tccaagatth	atgcatgggtg	cttccacatc	ttgcaacgca	480
gacgtatttg	catatgctgc	tgctaagatt	aagaatgcat	tagatgcaac	aattaaatta	540
ggcggtaaag	gttatgtatt	ctgggggtggt	cgtgaaggtt	atgaaacact	tcttaataca	600
gatttaggac	ttgagcttga	taatatggct	agacttatga	agatggctgt	agagtatggc	660
cgtgcaaatg	gttttgatgg	cgacttctat	attgagccaa	agccaaagga	accaaccaag	720
catcaatatg	atthtgatac	agcaaccgta	cttgctttcc	ttcgcaaata	tggttagaa	780
aaagatttca	agatgaacat	tgaagcaaac	catgctactc	ttgcaggtca	tacctttgaa	840
catgaacttg	caatggctag	agttaatggt	gcatttggtt	ctgtagatgc	aaaccagggt	900
gatccaaacc	ttggatggga	tacggatcaa	ttcccaactg	atgttcatag	tgcaactctt	960
gcaatgcttg	aagtacttaa	ggctggtgga	ttcactaacg	gcggaactaa	ctttgatgca	1020
aaghtaagac	gtggttcctt	cgaatttgat	gatattgcat	acggttatat	tgcaaggaatg	1080
gatacttttg	cacttggttt	aattaaggct	gctgagatta	tgcacgatgg	tagaatcgca	1140
aaatttgtag	atgatcgtha	tgcaagctat	aaaacaggaa	ttggtaaagc	aattgtggat	1200
ggaactacat	ctcttgaaga	attagagcag	tatgtthtaa	cacatagtga	accagtaatg	1260
cagagtggtc	gtcaggaagt	tcttgaacaa	atcgtaaata	atattttatt	tagataa	1317

ES 2 608 784 T3

<210> 2

<211> 438

<212> PRT

<213> Clostridium phytofermentans

<400> 2

Met Lys Asn Tyr Phe Pro Asn Val Pro Glu Val Lys Tyr Glu Gly Pro  
1 5 10 15

Asn Ser Thr Asn Pro Phe Ala Phe Lys Tyr Tyr Asp Ala Asn Lys Val  
20 25 30

Val Ala Gly Lys Thr Met Lys Glu His Cys Arg Phe Ala Leu Ser Trp  
35 40 45

Trp His Thr Leu Cys Ala Gly Gly Ala Asp Pro Phe Gly Val Thr Thr  
50 55 60

Met Asp Arg Thr Tyr Gly Asn Ile Thr Asp Pro Met Glu Leu Ala Lys  
65 70 75 80

Ala Lys Val Asp Ala Gly Phe Glu Leu Met Thr Lys Leu Gly Ile Glu  
85 90 95

Phe Phe Cys Phe His Asp Ala Asp Ile Ala Pro Glu Gly Asp Thr Phe  
100 105 110

Glu Glu Ser Lys Lys Asn Leu Phe Glu Ile Val Asp Tyr Ile Lys Glu  
115 120 125

Lys Met Asp Gln Thr Gly Ile Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala Asn Asn  
130 135 140

Phe Ser His Pro Arg Phe Met His Gly Ala Ser Thr Ser Cys Asn Ala  
145 150 155 160

Asp Val Phe Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ile Lys Asn Ala Leu Asp Ala  
165 170 175

Thr Ile Lys Leu Gly Gly Lys Gly Tyr Val Phe Trp Gly Gly Arg Glu  
180 185 190

Gly Tyr Glu Thr Leu Leu Asn Thr Asp Leu Gly Leu Glu Leu Asp Asn  
195 200 205

Met Ala Arg Leu Met Lys Met Ala Val Glu Tyr Gly Arg Ala Asn Gly  
210 215 220

ES 2 608 784 T3

Phe Asp Gly Asp Phe Tyr Ile Glu Pro Lys Pro Lys Glu Pro Thr Lys  
 225 230 235 240  
 His Gln Tyr Asp Phe Asp Thr Ala Thr Val Leu Ala Phe Leu Arg Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gly Leu Glu Lys Asp Phe Lys Met Asn Ile Glu Ala Asn His Ala  
 260 265 270  
 Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Glu His Glu Leu Ala Met Ala Arg Val  
 275 280 285  
 Asn Gly Ala Phe Gly Ser Val Asp Ala Asn Gln Gly Asp Pro Asn Leu  
 290 295 300  
 Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Thr Asp Val His Ser Ala Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Met Leu Glu Val Leu Lys Ala Gly Gly Phe Thr Asn Gly Gly Leu  
 325 330 335  
 Asn Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Gly Ser Phe Glu Phe Asp Asp Ile  
 340 345 350  
 Ala Tyr Gly Tyr Ile Ala Gly Met Asp Thr Phe Ala Leu Gly Leu Ile  
 355 360 365  
 Lys Ala Ala Glu Ile Ile Asp Asp Gly Arg Ile Ala Lys Phe Val Asp  
 370 375 380  
 Asp Arg Tyr Ala Ser Tyr Lys Thr Gly Ile Gly Lys Ala Ile Val Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Thr Thr Ser Leu Glu Glu Leu Glu Gln Tyr Val Leu Thr His Ser  
 405 410 415  
 Glu Pro Val Met Gln Ser Gly Arg Gln Glu Val Leu Glu Thr Ile Val  
 420 425 430  
 Asn Asn Ile Leu Phe Arg  
 435

## REIVINDICACIONES

1. Cepa de levadura caracterizada por que consiste en genes exógenos de la ruta metabólica de la xilosa, en la que los genes exógenos de la ruta metabólica de la xilosa presentes en la cepa de levadura consisten en al menos una copia de un gen exógeno que codifica una xilosa isomerasa, y una copia de un gen exógeno que codifica una xilitol deshidrogenasa, y en la que ha experimentado una etapa posterior de evolución dirigida que comprende las etapas sucesivas siguientes que consisten en someter a dicha cepa de levadura a:
- (i) una mutagenia,
  - (ii) un crecimiento en cultivos cíclicos bajo O<sub>2</sub> limitado en un medio que comprende al menos una pentosa, principalmente xilosa, y
- 10 (iii) una selección por crecimiento aerobio en medio sólido que contiene glicerol como única fuente de carbono.
2. Cepa de levadura según la reivindicación 1, en el que el gen exógeno que codifica una xilosa isomerasa es un gen de *Clostridium*, *Piromyces*, *Bacteroides*, *Streptomyces*, *Haemophilus*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Thermotoga*, *Fusobacterium*, *Geobacillus*, *Arthrobacter*, *Ciona*, *Physcomitrella*, *Cellvibrio*, *Chitinophaga*, *Saccharopolyspora* o *Salinibacter*, y preferiblemente es un gen de *Clostridium phytofermentans* o *Piromyces* sp. E2.
- 15 3. Cepa de levadura según la reivindicación 1 o 2, en el que el gen exógeno que codifica una xilitol deshidrogenasa procede de *Pichia stipitis*.
4. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 3, seleccionada entre *Saccharomyces* spp., *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Paffia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp., *Talaromyces* spp., *Brettanomyces* spp., *Pachysolen* spp. y *Debaryomyces* spp., y preferentemente es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 20 5. Cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que se elimina al menos una copia, preferentemente al menos dos copias, de un gen que codifica una aldosa reductasa.
6. Cepa de levadura según la reivindicación 5, en el que el gen eliminado es *GRE3*.
7. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que un gen endógeno que codifica una xilulocinasa, preferentemente el gen *XKS1*, se coloca bajo el control de un activador de un gen no reprimido por anaerobiosis o por represión catabólica inducida por cualquier fuente de carbono, y muy expresado en la fermentación alcohólica.
- 25 8. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que al menos un gen endógeno de la parte no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, preferentemente seleccionado entre los genes *RPE1*, *RK11*, *TKL1* y *TAL1*, y de manera especialmente preferida todos estos genes, se colocan bajo el control de un activador de un gen no reprimido por anaerobiosis o represión catabólica inducida por cualquier fuente de carbono, y muy expresado en la fermentación alcohólica.
- 30 9. Cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el activador es el activador de un gen que codifica una enzima de la glucólisis o que codifica una enzima alcohol deshidrogenasa, preferentemente el activador de *ADH1*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* o *GAL1/10*.
- 35 10. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que es una cepa aneuploide o poliploide y/o es una cepa protótrofa.
11. Cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que comprende al menos dos copias del gen exógeno que codifica una xilosa isomerasa, preferentemente al menos tres copias o al menos cuatro copias del gen exógeno que codifica una xilosa isomerasa.
- 40 12. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que es una cepa industrial que presenta resistencia a los inhibidores de fermentación procedentes de la hidrólisis de la biomasa, tales como los productos fenólicos, furfural o ácido acético.
13. Cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada por que produce una concentración de etanol de al menos 16%, preferentemente de al menos 17% v/v, en un hidrolizado de cereales, en condiciones de sacarificación y fermentación simultáneas a 32°C.
- 45 14. Cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada por que se selecciona del grupo consistente en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la C.N.C.M. el 23 de noviembre de 2010, con el nº I-4399, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la C.N.C.M. el 23 de noviembre de 2010, con el nº I-

4400, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la C.N.C.M. el 14 de diciembre de 2010, con el nº I-4417 y la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la C.N.C.M. el 5 de octubre de 2011, con el nº I-4538.

15. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada por que es una cepa derivada de una o más cepas definidas en la reivindicación 14.
- 5 16. Procedimiento de preparación de una cepa de levadura, que comprende la introducción en una cepa de partida de genes exógenos de la ruta metabólica de la xilosa, en el que los genes exógenos de la ruta metabólica de la xilosa introducidos en la cepa de levadura de partida consistentes en al menos una copia de un gen exógeno que codifica una xilosa isomerasa, y al menos una copia de un gen exógeno que codifica una xilitol deshidrogenasa, y que comprende además una etapa posterior de evolución dirigida que comprende las etapas sucesivas siguientes que consisten en
- 10 someter a dicha cepa de levadura a:
- (i) una mutagenia,
  - (ii) un crecimiento en cultivos cíclicos bajo O<sub>2</sub> limitado en un medio que comprende al menos una pentosa, principalmente xilosa, y
  - (iii) una selección por crecimiento aerobio en medio sólido que contiene glicerol como única fuente de carbono,
- 15 de manera que se obtengan mutantes sin insuficiencia respiratoria de dicha levadura que presenten un crecimiento en anaerobiosis en presencia de un medio que comprende al menos dicha pentosa.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, que comprende además la supresión de al menos una copia, preferiblemente al menos dos copias de un gen que codifica una aldosa reductasa, preferiblemente el gen *GRE3*, en la cepa de partida.
- 20 18. Procedimiento según la reivindicación 16 o 17, de preparación de una cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, de preparación de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* capaz de producir etanol a partir de un medio que comprende xilosa y que comprende las etapas siguientes, consistentes en:
- 25 (i) seleccionar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*,
- (ii) integrar las casetes de expresión siguientes en el genoma de la levadura de la etapa (i),
- a. la asociación del tipo de marco abierto de lectura (ORF) de un gen que codifica una xilosa isomerasa bajo el control de un activador y de un terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, estando dicha casete flanqueada aguas arriba y aguas abajo de las regiones recombinógenas que permiten la integración dirigida en el genoma,
  - 30 b. la asociación del tipo marco abierto de lectura (ORF) de un gen que codifica una xilitol deshidrogenasa bajo el control de un activador y un terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, estando dicha casete flanqueada aguas arriba y aguas abajo de las regiones recombinógenas que permiten su integración dirigida en el genoma,
- (iii) inducir la expresión de al menos un gen de cada etapa de la parte no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato así como al menos un gen que codifica la xilulocinasa (XKS1), colocándolos bajo el control de un activador
- 35 de un gen no reprimido ni por anaerobiosis ni por represión catabólica inducida por cualquier fuente de carbono, y muy expresado en la fermentación alcohólica, y
- (iv) suprimir al menos dos copias del marco de lectura abierto (ORF) del gen *GRE3* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica una aldosa reductasa.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, caracterizado por que el gen que codifica una xilosa isomerasa es un gen
- 40 XI que codifica la enzima xilosa isomerasa seleccionada entre las presentes en los genomas de *Clostridium*, *Piromyces*, *Bacteroides*, *Streptomyces*, *Haemophilus*, *Burkholderia*, *Enterococcus*, *Thermotoga*, *Fusobacterium*, *Geobacillus*, *Arthrobacter*, *Ciona*, *Physcomitrella*, *Cellvibrio*, *Chitinophaga*, *Saccharopolyspora* o *Salinibacter*.
21. Procedimiento según las reivindicaciones 19 o 20, caracterizado porque dicho gen XI se selecciona entre un gen de *Clostridium phytofermentans* o de *Piromyces* sp. E2.
- 45 22. Procedimiento según las reivindicaciones 19 o 20, caracterizado por que el gen que codifica una xilitol deshidrogenasa es un gen de *Pichia stipitis* que codifica la enzima xilitol deshidrogenasa.
23. Procedimiento según una de las reivindicaciones 19 a 21, caracterizado por que la cepa de levadura de la etapa (i) presenta una actividad xilitol deshidrogenasa XDH endógena inferior a 150mKat/g de proteínas.

24. Procedimiento según una de las reivindicaciones 19 a 23, caracterizado por que la cepa de levadura de la etapa (i) se selecciona entre las cepas industriales que presentan una resistencia a los inhibidores de la fermentación procedentes de la hidrólisis de la biomasa, tales como los productos fenólicos, el furfural y el ácido acético.
25. Procedimiento según una de las reivindicaciones 19 a 24, caracterizado por que el activador de *Saccharomyces cerevisiae* de la etapa (iii) se selecciona entre el grupo que comprende los activadores de genes que codifican las enzimas glucolíticas y los que codifican las enzimas alcohol deshidrogenasa.
26. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, caracterizado por que dicho grupo está constituido por *ADH1*, *PGK1*, *TDH3*, *PDC2* y *GAL1/10*, preferiblemente *ADH1*, y por que el terminador de *Saccharomyces cerevisiae* está constituido por *CYC1* o por el propio terminador del gen de la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato.
27. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, caracterizado por que la cepa de la etapa (i) es una cepa industrial seleccionada entre las cepas capaces de producir altas concentraciones de etanol, de al menos 17% v/v, en un hidrolizado de cereales, en condiciones de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) y a 32°C.
28. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, caracterizado por que comprende además una o varias etapas de inserción de marcadores de resistencia a antibióticos, una o varias etapas de selección de cepas según el criterio de su resistencia a los antibióticos, y una o varias etapas de escisión de marcadores de resistencia a los antibióticos.
29. Procedimiento de producción de etanol, a partir de un medio que comprende xilosa, por fermentación de una levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o de una levadura obtenida por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 28.
30. Procedimiento según la reivindicación 29 caracterizado porque el medio comprende una mezcla de xilosa y arabinosa.
31. Procedimiento según las reivindicaciones 29 o 30, caracterizado porque dicho medio se selecciona del grupo constituido por los hidrolizados de lignina, de celulosa, de hemicelulosa o de almidón.

Figura 1

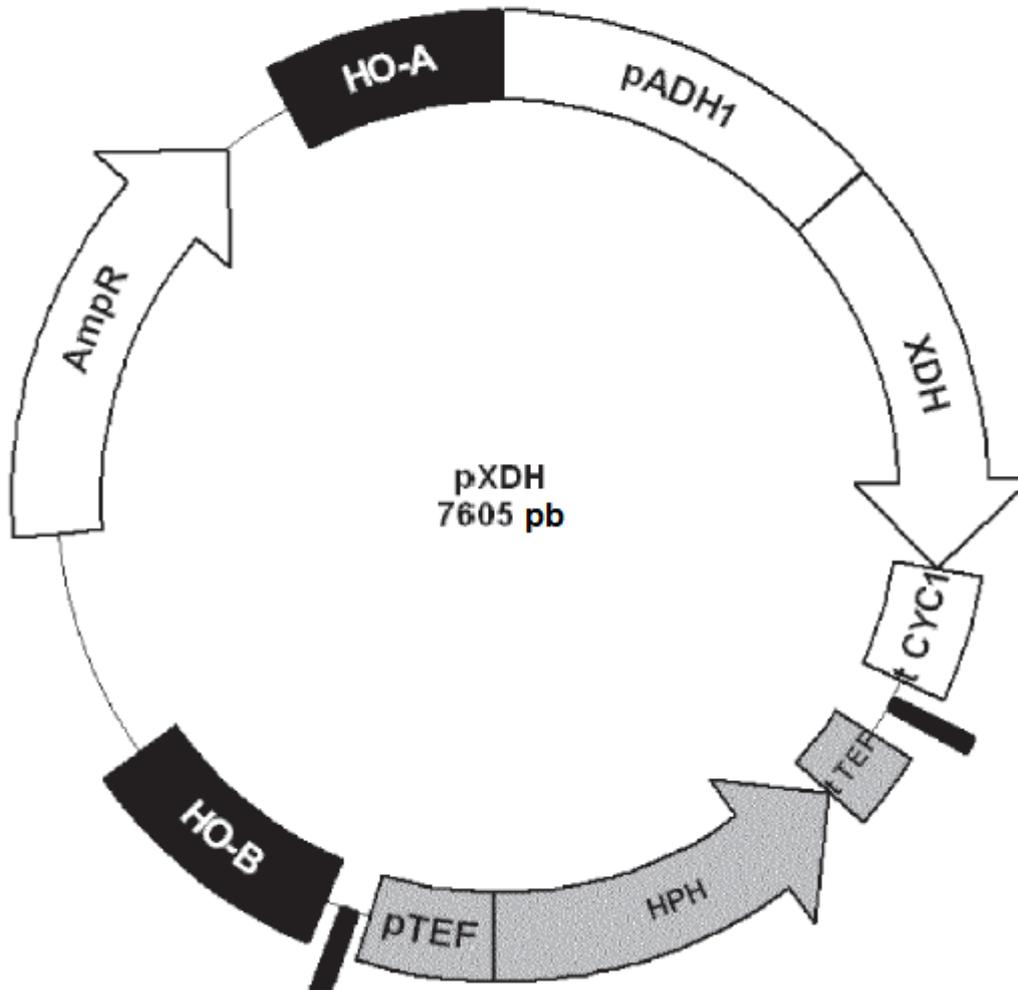


Figura 2

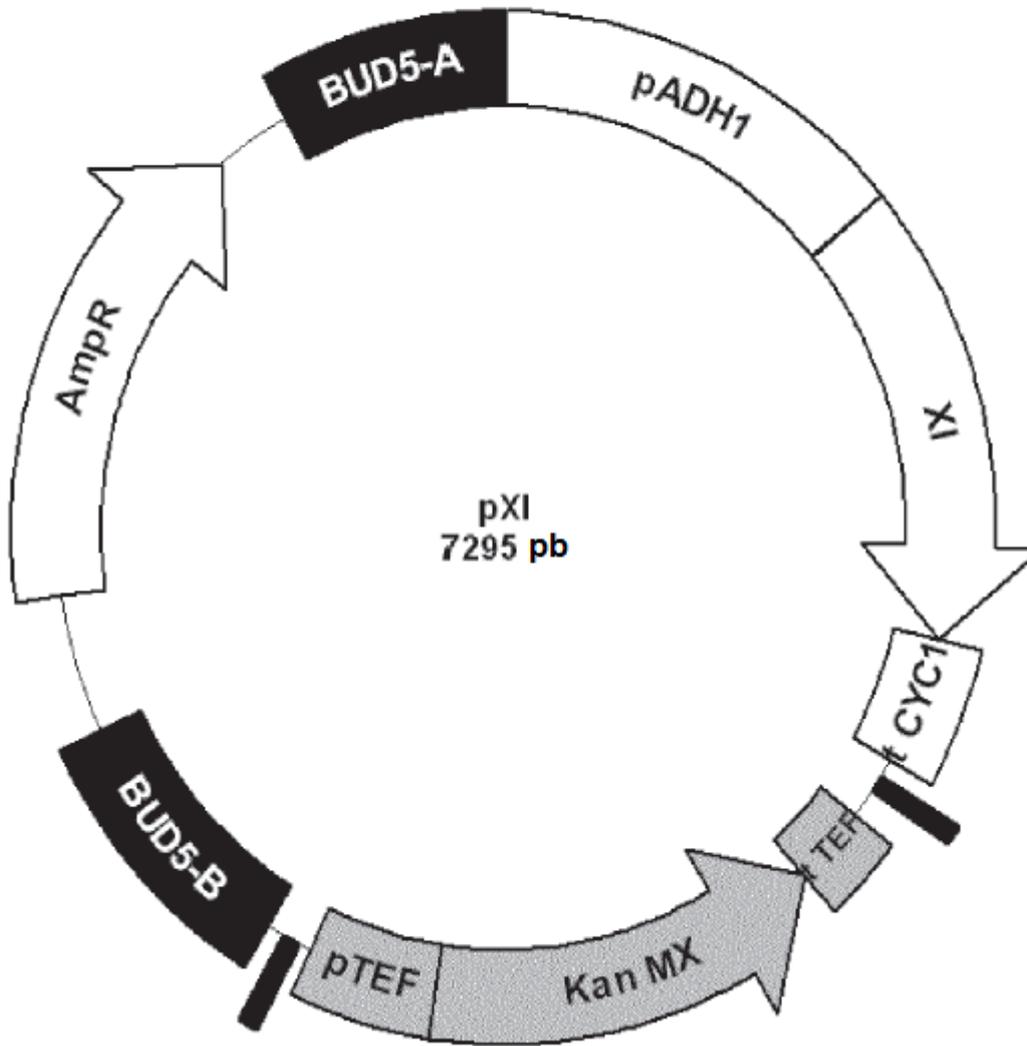


Figura 3

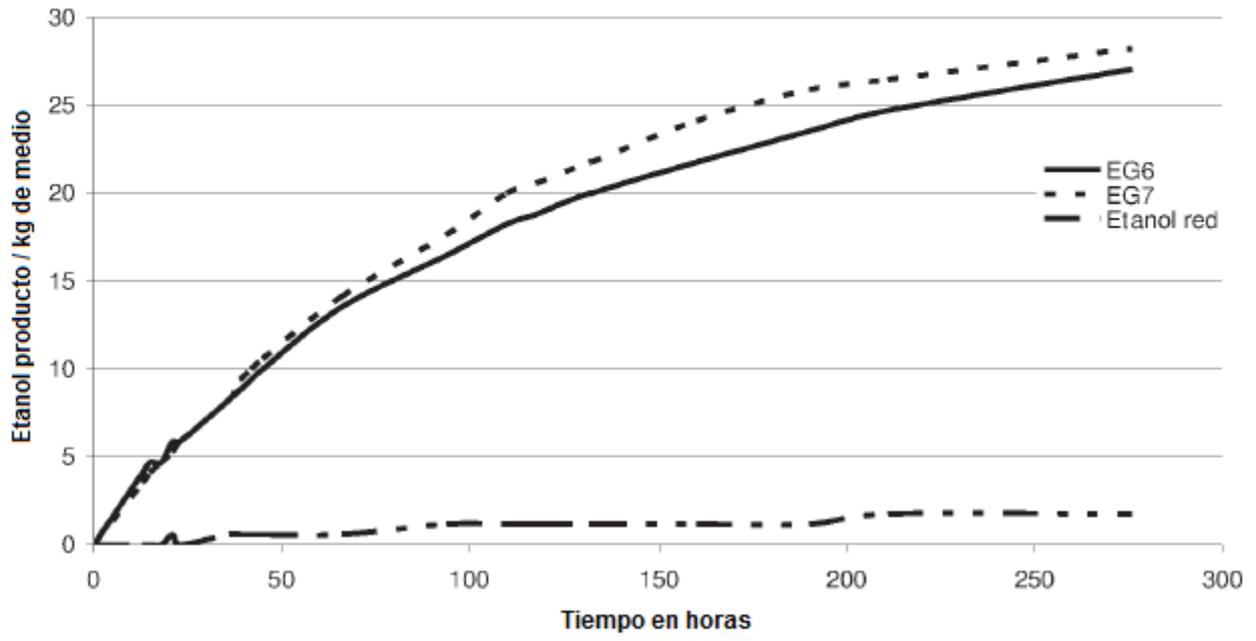


Figure 4

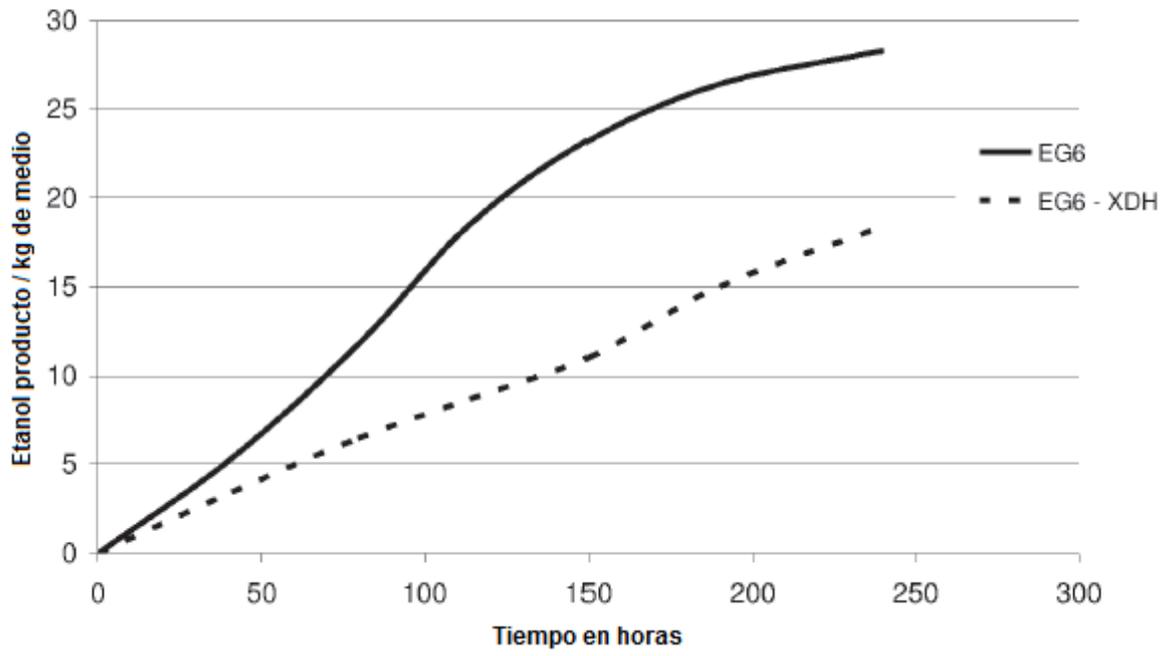


Figura 5

