

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 390**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12G 1/00 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2010 PCT/FR2010/000834**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011 WO11080411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2010 E 10808994 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2513291**

54 Título: **Nuevas cepas de levadura para la producción de alcohol**

30 Prioridad:

15.12.2009 FR 0906049

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

16.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAVOUZET, JEAN-MICHEL;
LADRIERE, JEAN-MARC;
TBAIKHI, ANNIE y
WYME, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 642 390 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

Nuevas cepas de levadura para la producción de alcohol

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevas cepas de levadura y a levaduras derivadas de estas nuevas cepas destinadas a la producción de alcohol en medios tóxicos, a un procedimiento de selección de dichas cepas, así como a un procedimiento de producción de alcohol, en particular en medios tóxicos.

Antecedentes tecnológicos

Es conveniente para un industrial reciclar las aguas derivadas de fermentaciones para utilizarlas en un nuevo medio de fermentación. Esto permite, entre otras cosas, reducir las entradas y salidas de aguas de los fermentadores.

10 El reciclaje de aguas se realiza de forma tradicional después de la fermentación en medios que contienen fuentes de azúcares derivados de la remolacha o caña, tales como los medios EP2 (*Egout Pauvre derivado de la 2ª cristalización del azúcar*), pero también después de la fermentación en medios que contienen azúcares derivados del trigo o del maíz.

15 Las aguas de reciclaje permiten proporcionar elementos nutricionales para la levadura, pero presentan sobre todo una toxicidad para la levadura, toxicidad que va a aumentar a medida que aumenta la tasa de reciclaje.

Por otra parte, ciertas materias primas utilizadas en los medios de fermentación son en sí mismas tóxicas para la levadura. Es por ejemplo el caso de las melazas (llamadas también EP3 o *Egout Pauvre derivado de la 3ª cristalización del azúcar*).

20 La toxicidad de las aguas de reciclaje y de estas materias primas tóxicas resulta en particular de la presencia de ácidos orgánicos y de sales.

En un medio tóxico que contiene, parcial o totalmente, aguas de reciclaje y/o materias primas tóxicas, las levaduras conocidas utilizadas en fermentación alcohólica tienen una cinética de producción de alcohol menos rápida que en un medio no tóxico. Además, la cantidad máxima de alcohol producido por las levaduras conocidas en fermentación en un medio tóxico es menor que en un medio no tóxico.

25 Cuando las materias primas utilizadas son tóxicas en sí mismas, su dilución en el medio de fermentación permite limitar su efecto tóxico. Sin embargo, esta dilución genera costes adicionales muy importantes, ligados en particular a una menor productividad en volumen y a costes de enfriamiento y de destilación mayores.

30 Los intentos de resolver el problema de los medios tóxicos se han enfocado hasta ahora en hacer el medio de fermentación menos tóxico. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna solución realmente satisfactoria a este problema. Otro enfoque ha sido seleccionar cepas de levadura resistentes a un medio tóxico por un procedimiento de aclimatación de la levadura (documento WO 2009/137804).

Por tanto, existe una necesidad real de proporcionar una solución alternativa para mejorar la producción de alcohol por las levaduras en medios de fermentación tóxicos.

35 Por "mejora de la producción de alcohol" se entiende una mejora de la cinética de producción de alcohol en un medio de fermentación tóxico, al tiempo que se mantiene una cantidad aceptable de alcohol producido.

Compendio de la invención

Un primer objetivo de la invención es proporcionar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada entre la cepa depositada en la CNCM con el número I-4264, la cepa depositada en la CNCM con el número I-4265, la cepa depositada en la CNCM con el número I-4411 y la cepa depositada en la CNCM con el número I-4412.

40 Otro objetivo de la invención concierne a un procedimiento de selección de una cepa resistente a un medio tóxico que comprende:

45 - una etapa de preselección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad máxima de alcohol producido, en un medio de selección no tóxico en condiciones de azúcar no limitante, es superior o igual a 92% de la cantidad máxima de alcohol producido, en el medio de selección no tóxico, por la cepa de referencia depositada el 4 de septiembre de 2008 en la CNCM con el número I-4071,

50 - una etapa de fermentación en un medio de selección tóxico y en un medio de selección no tóxico, de al menos una cepa de levadura preseleccionada, siendo la composición inicial del medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado seleccionado de ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido levulínico o una mezcla de éstos, y siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y en el medio de

- selección no tóxico, en donde la concentración de ácido orgánico no ionizado en el medio de selección tóxico es una concentración que conlleva una disminución de la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de referencia número I-4071 de 25% a 75%, preferiblemente una disminución de 40% a 75%, respecto a la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa de número de referencia I-4071 en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio de selección no tóxico, en donde el instante $t_{\max \text{ ref}}$ es el instante en el que se alcanza la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa de número de referencia I-4071 en el medio de selección no tóxico,
- una etapa de selección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} en el medio de selección tóxico es superior o igual a 65% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} por dicha cepa en el medio de selección no tóxico, en donde el instante t_{\max} es el instante en el que se alcanza la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa de levadura en el medio de selección no tóxico, y
 - una etapa suplementaria de selección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en dicho medio de selección tóxico es superior a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura de número de referencia I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado.

- Otro objetivo de la invención es una cepa obtenida por el procedimiento tal como se ha definido anteriormente. También se describen en la presente memoria cepas de *Saccharomyces cerevisiae* derivadas de una cepa tal como se ha definido anteriormente.
- Otro objetivo de la invención es una levadura obtenida por cultivo de una cepa de levadura tal como se ha definido anteriormente.

- Otro objetivo de la invención se refiere a la utilización de una levadura tal como se ha definido anteriormente para la producción de alcohol.
- Otro objetivo de la invención es un procedimiento de producción de alcohol que comprende una etapa de fermentación de al menos una levadura tal como se ha definido anteriormente, en un medio de fermentación.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: cantidad máxima de alcohol producido al final de una fermentación en un medio de selección no tóxico (fermentación en azúcares no limitantes).
- La cantidad máxima de alcohol producido (en g/kg de medio inicial) se indica en ordenadas para cada uno de los híbridos 1 a 13 probados (eje de abscisas). "T" corresponde a la cepa de referencia I-4071.
- Figura 2: impacto de un medio de selección tóxico sobre la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} (fermentación en azúcares limitantes).
- El eje de ordenadas indica la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} en un medio de selección tóxico como porcentaje de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} en un medio de selección no tóxico.
- El eje de abscisas indica los híbridos probados (1, 2, 8 y 11).
- Figura 3: cinética de producción de alcohol en fermentación en un medio de selección sintético tóxico (3,6 g/kg de acetato a pH 4,5, fermentación en azúcares limitantes).
- El eje de ordenadas indica la pérdida de masa (en g/kg de medio inicial) y el eje de abscisas indica el tiempo en horas.
- La cepa de referencia I-4071 está representada por la curva de puntos con los rombos negros, la cepa de levadura I-4264 (híbrido 1) por la curva con los triángulos, la cepa de levadura I-4265 (híbrido 2) por la curva con los cuadrados, el híbrido 8 por la curva con los círculos y el híbrido 11 por la curva con los rombos grises.
- Figura 4: cinética de producción de alcohol en fermentación en un medio de aplicación sintético tóxico (5 g/kg de acetato a pH 4,5, fermentación en azúcares no limitantes).
- El eje de ordenadas indica la pérdida de masa (en g/kg de medio inicial) y el eje de abscisas el tiempo en horas.
- La cepa de referencia I-4071 está representada por la curva de puntos con los rombos negros, la cepa de levadura I-4264 (híbrido 1) por la curva con los triángulos, la cepa de levadura I-4265 (híbrido 2) por la curva con los cuadrados, el híbrido 8 por la curva con los círculos y el híbrido 11 por la curva con los rombos grises.
- Figura 5: cinética de producción de alcohol en fermentación en un medio de aplicación tóxico A que contiene vinaza (fermentación en azúcares no limitantes).

El eje de ordenadas indica la pérdida de masa (en g/kg de medio inicial) y el eje de abscisas el tiempo en horas.

La cepa de referencia I-4071 está representada por la curva de puntos con los rombos negros, la cepa de levadura I-4264 por la curva con los triángulos y la cepa de levadura I-4265 por la curva con los cuadrados.

5 Figura 6: cinética de producción de alcohol en fermentación en un medio de aplicación tóxico B que contiene vinaza (fermentación en azúcares no limitantes).

El eje de ordenadas indica la pérdida de masa (en g/kg de medio inicial) y el eje de abscisas el tiempo en horas.

La cepa de referencia I-4071 está representada por la curva de puntos con los rombos negros, la cepa de levadura I-4264 por la curva con los triángulos y la cepa de levadura I-4265 por la curva con los cuadrados.

10 Figura 7: cinética de producción de alcohol en fermentación en un medio de aplicación tóxico C que contiene melaza de remolacha poco diluida (fermentación en azúcares no limitantes).

El eje de ordenadas indica la pérdida de masa (en g/kg de medio inicial) y el eje de abscisas el tiempo en horas.

La cepa de referencia I-4071 está representada por la curva de puntos con los rombos negros, la cepa de levadura I-4264 por la curva con los triángulos y la cepa de levadura I-4265 por la curva con los cuadrados.

15 Figura 8: cinética de producción de alcohol en fermentación en un medio de aplicación tóxico D que contiene melaza de caña poco diluida (fermentación en azúcares no limitantes).

El eje de ordenadas indica la pérdida de masa (en g/kg de medio inicial) y el eje de abscisas el tiempo en horas.

La cepa de referencia I-4071 está representada por la curva de puntos con los rombos negros, la cepa de levadura I-4264 por la curva con los triángulos y la cepa de levadura I-4265 por la curva con los cuadrados.

20 Figura 9: cinética de producción de alcohol en fermentación en un medio de aplicación tóxico E que contiene melaza de la vinaza (fermentación en azúcares no limitantes).

El eje de ordenadas indica la pérdida de masa (en g/kg de medio inicial) y el eje de abscisas el tiempo en horas.

La cepa de referencia I-4071 está representada por la curva de puntos con los rombos negros, la cepa de levadura I-4264 por la curva con los triángulos y la cepa de levadura I-4265 30 por la curva con los cuadrados.

Descripción detallada de la invención

25 Los inventores han desarrollado una solución alternativa original para mejorar la producción de alcohol por las levaduras en medios de fermentación tóxicos. Esta solución alternativa consiste en seleccionar nuevas cepas de levadura resistentes a un medio de fermentación tóxico por medio de un procedimiento original de selección de cepas. Por tanto, al proporcionar una cepa de levadura resistente a un medio de fermentación tóxico se obtiene una levadura resistente a un medio de fermentación tóxico.

30 Un medio de fermentación tóxico es un medio de fermentación que comprende al menos un factor de estrés.

Un factor de estrés es por ejemplo un estrés ligado a la presencia de ácidos orgánicos, un estrés ligado a la presencia de sales, un estrés ligado a la presencia de otras moléculas orgánicas inhibitoras, o un estrés ligado a la presión osmótica.

35 Por "otras moléculas orgánicas inhibitoras" se entiende por ejemplo los compuestos aromáticos bencénicos y furánicos.

Un factor de estrés particular es la presencia de al menos un ácido orgánico no ionizado a una concentración total tóxica.

La expresión "concentración total" indica la concentración correspondiente a todos los ácidos orgánicos no ionizados presentes en el medio de fermentación.

40 Un "ácido orgánico no ionizado" o "ácido orgánico en forma no ionizada" es un ácido carboxílico en forma protonada.

Se puede definir una concentración tóxica de ácido(s) orgánico(s) no ionizado(s) en relación con su efecto tóxico sobre la producción de alcohol de una cepa de levadura de referencia. Una cepa de levadura de referencia del Solicitante para la producción de alcohol es la cepa de levadura depositada el 4 de septiembre de 2008 en la CNCM con el número I-4071.

45 Con el fin de evaluar la toxicidad de una concentración dada de ácido(s) orgánico(s) no ionizado(s), se compara:

- la cantidad de alcohol producido por la cepa de referencia I-4071, medida en el instante t_{max} , en un medio de fermentación en azúcares limitantes y que contiene el o los ácidos orgánicos no ionizados, y
- la cantidad de alcohol producido por dicha cepa de referencia, medida en el instante t_{max} , en un medio de fermentación de la misma composición, excepto que esencialmente no comprende ácido orgánico no ionizado.

5

Una concentración tóxica de ácido(s) orgánico(s) no ionizado(s) es entonces, por ejemplo, una concentración que comporta una disminución de 25% a 75% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} por la cepa de levadura número I-4071 con relación a la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa en el instante t_{max} , en un medio de la misma composición pero que esencialmente no comprende ácido orgánico no ionizado, preferiblemente de 40% a 75%.

10

Dicho "medio de fermentación que contiene el o los ácidos orgánicos no ionizados" se llama medio de selección tóxico más adelante.

Dicho "medio de fermentación de la misma composición excepto que esencialmente no comprende ácido orgánico no ionizado" se llama medio de selección no tóxico más adelante.

15

El medio de selección no tóxico comprende el conjunto de los nutrientes necesarios para permitir un crecimiento celular de al menos 5 g de equivalente de levadura seca por kg de medio.

Por "instante t_{max} " se indica el instante en el que se alcanza la cantidad máxima de alcohol producido por una cepa de levadura en un medio de selección no tóxico.

20

La curva de fermentación alcohólica que representa la cantidad de alcohol producido en función del tiempo comprende generalmente tres fases:

- una fase de latencia, durante la cual no hay producción de etanol,
- una fase de producción de alcohol, y
- una fase de meseta, que corresponde al final de la fermentación.

25

La cantidad máxima de alcohol producido corresponde a la cantidad de alcohol producido cuando se alcanza la fase de meseta de una fermentación alcohólica.

Más adelante se utilizan indistintamente los términos "alcohol" y "etanol".

Las expresiones "en azúcares limitantes" o "azúcares que son el factor limitante de la fermentación" significan que la fermentación se para cuando los azúcares fermentables se consumen totalmente en el medio de fermentación.

30

Las expresiones "en azúcares no limitantes" o "azúcares que no son el factor limitante de la fermentación" significan que la fermentación se para cuando los azúcares fermentables no se consumen totalmente en el medio de fermentación.

35

Un medio que esencialmente no comprende ácidos orgánicos no ionizados es un medio en el que la cantidad de alcohol producido por la cepa de levadura número I-4071 no se modifica significativamente a lo largo de toda la duración de la fermentación con respecto a la cantidad de alcohol producido por dicha cepa en un medio de la misma composición, excepto que no contiene ningún ácido orgánico no ionizado.

Por ejemplo, un medio que comprende una concentración inferior o igual a 100 mM de ácido cítrico a un pH de 4,5 a 5,5 es un medio que esencialmente no comprende ácido orgánico en forma no ionizada.

La expresión "cepa de levadura" indica una población relativamente homogénea de células de levadura.

40

Una cepa de levadura se obtiene a partir del aislamiento de un clon, siendo un clon una población de células obtenida a partir de una única célula de levadura.

Una cepa de levadura según la invención es preferiblemente una cepa de levadura no modificada genéticamente.

Por "cepa de levadura resistente a un medio tóxico" se indica una cepa de levadura cuya cinética de producción de alcohol no se ralentiza demasiado en un medio de fermentación tóxico.

45

Preferiblemente, una cepa de levadura resistente a un medio tóxico tiene una cinética de producción de alcohol menos ralentizada que la de una cepa clásica destinada a la producción de alcohol, por ejemplo tal como la cepa de levadura depositada en la CNCM con el número I-4071.

Con el fin de seleccionar nuevas cepas de levadura resistentes a un medio tóxico, los inventores han desarrollado un nuevo procedimiento original de selección de cepas de levadura. La implementación de este procedimiento ha

permitido en particular obtener las 2 nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* depositadas el 2 de diciembre de 2009 en virtud del tratado de Budapest ante la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) con los números I-4264 e I-4265.

5 Normalmente, cuando se evalúan cepas de levadura destinadas a la producción de alcohol, se utiliza como criterio de selección la cantidad máxima de alcohol producido al final de una fermentación.

El procedimiento de selección de cepas de levadura resistentes a un medio tóxico descrito en esta memoria utiliza como criterio de selección la cinética de producción de alcohol.

10 Así, el procedimiento de selección comprende una etapa de selección de cepas de levadura sobre la base de su cinética de producción de alcohol en un medio de selección tóxico en azúcares limitantes con respecto a su cinética de producción de alcohol en un medio de selección no tóxico en azúcares limitantes.

El procedimiento de selección comprende una etapa adicional de selección de las cepas de levadura sobre la base de su cinética de producción de alcohol en un medio de selección tóxico en azúcares limitantes con respecto a la cinética de producción de alcohol de una cepa de levadura de referencia en ese mismo medio de selección tóxico.

15 El procedimiento de selección comprende también una etapa adicional de selección de las cepas de levadura sobre la base de su cantidad máxima de alcohol producido en un medio de selección no tóxico en azúcares no limitantes con respecto a la cantidad máxima de alcohol producido por una cepa de levadura de referencia en el mismo medio de selección no tóxico. Cuando el procedimiento comprende las dos etapas adicionales de selección, las diversas etapas de selección se llevan a cabo en cualquier orden.

20 El procedimiento de selección puede comprender además una etapa previa de obtención de cepas de levadura por cruce y/o mutagénesis.

En la presente memoria se describe un procedimiento de selección de una cepa de levadura resistente a un medio tóxico que comprende:

- una etapa de fermentación de al menos una cepa de levadura en un medio de selección tóxico y en un medio de selección no tóxico,
- 25 siendo la composición inicial del medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica y siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y en el medio de selección no tóxico, y
- una etapa de selección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} en el medio de selección tóxico es superior o igual a 65% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} , por dicha cepa en el medio de selección no tóxico.
- 30

Por "composición inicial" se indica la composición del medio de selección cuando comienza la fermentación.

35 Cuando el medio de selección comprende más de un ácido orgánico no ionizado, la concentración tóxica es la concentración tóxica total de ácidos orgánicos no ionizados. Situándose "en azúcares limitantes", esto permite estar en condiciones favorables para evaluar la cinética de producción de alcohol, sin sesgo ligado a la tolerancia de la cepa al alcohol y sin sesgo ligado a la presión osmótica inicial relacionada con los azúcares.

La fermentación se realiza en ausencia de aireación.

La fermentación se realiza preferiblemente con agitación.

El pH inicial de los medios de selección tóxico y no tóxico son idénticos.

40 El pH de los medios de selección tóxico y no tóxico es tal que no inhibe el metabolismo de la cepa de levadura.

Por ejemplo, el pH de los medios de selección tóxico y no tóxico es superior a 3,5 a lo largo de la duración de la fermentación.

En un modo de realización conveniente del procedimiento de selección, la etapa de fermentación se lleva a cabo a pH constante.

45 La siembra del medio de selección es idéntica en el medio de selección tóxico y en el medio de selección no tóxico.

Preferiblemente, la siembra es baja, con el fin de no favorecer cepas de levadura sobre el medio de selección tóxico, debido a la siembra.

La siembra está comprendida, por ejemplo, entre 0,100 g y 0,200 g de células de la cepa de levadura (en equivalente de materia seca) por kg de medio.

La fermentación de la cepa de levadura se lleva a cabo generalmente a una temperatura comprendida entre 28°C y 37°C, preferiblemente entre 30°C y 33°C.

5 Preferiblemente, la fermentación de la cepa de levadura se lleva a cabo a una temperatura de 32°C.

Preferiblemente, el medio de selección tóxico y el medio de selección no tóxico no contiene pentosas, sustrato lignocelulósico, hidrolizado o mosto de cereales, compuestos aromáticos bencénicos, compuestos aromáticos furánicos y/o melaza.

10 Preferiblemente, la presencia de al menos un ácido orgánico no ionizado a una concentración total tóxica es el único factor de estrés en el medio de selección tóxico utilizado. En particular, los medios de selección tóxico y no tóxico no presentan estrés ligado a la presencia de sales, estrés ligado a la presencia de otras moléculas orgánicas inhibitoras y/o estrés ligado a la presión osmótica.

La cantidad de alcohol producido se mide por cualquier medio apropiado conocido por el experto en la técnica.

15 Se puede tratar de una medida directa del alcohol producido o de una medida indirecta a través de un parámetro correlacionado con la producción de alcohol.

Por ejemplo, la producción de alcohol se puede medir por cromatografía, en particular por CLHP (*Cromatografía en fase Líquida de Alta Resolución*), CPG (*Cromatografía en Fase Gaseosa*), densimetría, estuche enzimático (por ejemplo, estuche de dosificación del etanol de Boehringer-Mannheim R-Biopharm, Cat n° 10 176 290 035) o una dosificación por dicromato potásico.

20 La producción de alcohol se puede medir también de manera indirecta en una prueba de fermentación alcohólica por medida de la pérdida de masa.

El instante t_{max} es el instante en el que se alcanza la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa de levadura en dicho medio de selección no tóxico.

25 En esta memoria se describe un procedimiento de selección tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que comprende:

- una etapa de fermentación de al menos una cepa de levadura en un medio de selección tóxico y en un medio de selección no tóxico,

siendo la composición inicial del medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica y

30 siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y en el medio de selección no tóxico, y

- una etapa de selección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} en el medio de selección tóxico es superior o igual a 70%, preferiblemente superior o igual a 75%, de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} por dicha cepa en el medio de selección no tóxico.

35

También se describe en esta memoria un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que el medio de selección tóxico y el medio de selección no tóxico son medios sintéticos.

Un medio sintético es un medio cuya composición química exacta se conoce.

40 Un medio sintético comprende una fuente de carbono única, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, así como las vitaminas y minerales esenciales para el crecimiento de una cepa de levadura.

La fuente de carbono del medio sintético es un azúcar fermentable, preferiblemente un azúcar suministrado en forma de glucosa o sacarosa.

Las fuentes de nitrógeno y de fósforo son, por ejemplo, proporcionadas por DAP (fosfato di-amónico o $(NH_4)_2HPO_4$).

45 El medio sintético puede estar tamponado a un pH dado, preferiblemente a un pH superior a 3,5. Por ejemplo, el medio sintético puede comprender ácido cítrico como tampón. Como excepción a la definición de un medio sintético, el medio sintético puede comprender un extracto de levadura.

Medios sintéticos apropiados para la utilización del procedimiento de selección son por ejemplo los medios de selección tóxico y no tóxico, en azúcares limitantes, descritos en el ejemplo 1.

5 También se describe en esta memoria un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que el ácido orgánico no ionizado se selecciona entre ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido levulínico o una mezcla de éstos.

Preferiblemente, un procedimiento de selección tal como se ha definido anteriormente se caracteriza por que el ácido orgánico no ionizado es ácido acético.

10 También se describe en esta memoria un procedimiento de selección que comprende también una etapa de selección de las cepas de levadura sobre la base de su cinética de producción de alcohol en el medio de selección tóxico con relación a la cinética de producción de alcohol de una cepa de levadura de referencia en este mismo medio de selección tóxico.

15 También se describe en esta memoria un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que comprende una etapa adicional de selección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en dicho medio de selección tóxico es superior a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado.

El instante $t_{\max \text{ ref}}$ es el instante t_{\max} de la cepa de referencia I-4071, es decir, el instante en el que se alcanza la cantidad máxima de alcohol producido por la cepa de referencia I-4071 en el medio de selección no tóxico.

El medio de selección tóxico y el medio de selección no tóxico son tales como se han definido anteriormente, en particular los medios de selección tóxico y no tóxico están en la condición de azúcares limitantes.

20 La cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en dicho medio de selección tóxico por la cepa de levadura seleccionada se incrementa preferiblemente en al menos 15%, preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado.

25 También se describe en esta memoria un procedimiento de selección que comprende una etapa adicional de selección de las cepas de levadura sobre la base de su cantidad máxima de alcohol producido en un medio de selección no tóxico en azúcares no limitantes con relación a la cantidad máxima de alcohol producido por una cepa de levadura de referencia en el mismo medio de selección no tóxico.

30 Con el fin de comparar las cepas de levadura sobre la base de su cantidad máxima de alcohol producido, el azúcar no es entonces el factor limitante de la fermentación. En este caso, es la concentración de alcohol en el medio de selección no tóxico la que se convierte en el factor limitante de la fermentación.

Cuando mayor es la cantidad de alcohol producido al final de la fermentación, más tolerante al alcohol es la cepa de levadura.

35 También se describe en esta memoria un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que comprende una etapa adicional de selección, en un medio de selección no tóxico en el que el azúcar no es el factor limitante de la fermentación, de al menos una cepa de levadura cuya cantidad máxima de alcohol producido es superior o igual a 90% de la de la cepa número I-4071, preferiblemente superior o igual a 92% de la de la cepa número I-407 en el mismo medio de selección no tóxico mencionado. El procedimiento comprende de manera conveniente las tres etapas de selección tales como se han definido anteriormente.

Un ejemplo de procedimiento de selección según la invención se detalla en el ejemplo 1.

40 De manera sorprendente e inesperada, el procedimiento de selección de cepas resistentes según la invención ha permitido obtener cepas de levadura resistentes a un medio tóxico que presentan a la vez una cinética de producción de alcohol mejorada en un medio tóxico, y una elevada cantidad máxima de alcohol producido en un medio no tóxico en azúcares no limitantes.

45 Ahora bien, las cepas de levadura presentan generalmente ya sea una buena cinética de producción de alcohol en un medio tóxico, o una elevada cantidad máxima de alcohol producido en un medio no tóxico en azúcares no limitantes, siendo mejorado uno de estos dos parámetros en detrimento del otro.

También se describe en esta memoria un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado por que comprende una etapa previa de obtención de cepas de levadura por cruce y/o mutagénesis.

50 El cruce de cepas de levadura se realiza según las técnicas clásicas, como las que se enseñan en el capítulo 7 "Esporulación e Hibridación de Levadura" por RR. Fowell, del libro de referencia "Las Levaduras", volumen 1, editado por A.H. Rose y J.S. Harrison, 1969-Academic Press.

Una técnica convencional de cruce comprende:

- una etapa de esporulación de levaduras para obtener segregantes,
- una etapa opcional de selección de segregantes procedentes de al menos uno de los dos padres sobre la base de la cantidad máxima de alcohol producido, y
- una etapa de cruce de segregantes, para obtener híbridos.

5 Los híbridos constituyen nuevas cepas de levadura utilizadas para seleccionar cepas de levadura resistentes a un medio tóxico.

Por el término “mutagénesis” se indica a la vez la mutagénesis convencional obtenida por radiación o por agentes químicos mutagénicos y la mutagénesis por inserción mediante transposición o por integración de un fragmento de ADN exógeno.

10 La mutagénesis por radiación implica la utilización de radiación UV, X, o gamma. Los agentes químicos mutagénicos son por ejemplo el EMS (metilsulfonato de etilo), EES (etilsulfonato de etilo), nitrosoguanidina, ácido nitroso, aflatoxina B1, hidroxilamina, 5-bromouracilo, 2-aminopurina, proflavina, naranja de acridina. En un modo de realización conveniente, la etapa de obtención de cepas de levadura comprende una etapa de mutagénesis convencional, opcionalmente seguida por un enriquecimiento, por ejemplo en un medio tóxico.

15 La resistencia de las cepas de levadura I-4264 e I-4265 según la invención se ha verificado en un medio sintético tóxico que presenta una toxicidad más alta ligada al ácido acético (5 g/kg a pH 4,5) y que presenta además una toxicidad ligada al alcohol, ya que el azúcar no es el factor limitante de la fermentación.

El azúcar se suministra entonces preferiblemente en forma de dextrina para evitar un estrés osmótico ligado al azúcar.

20 Las cepas de levadura I-4264 e I-4265 han mostrado una ventaja cinética sobre la cepa de levadura de referencia I-4071 en este medio sintético tóxico (ver ejemplo 1 y 10 figura 4).

De manera sorprendente e inesperada, el procedimiento de selección según la invención permite obtener cepas de levadura cuya cinética de producción de alcohol es más rápida que la de la cepa de referencia número I-4071 en un medio de aplicación industrial tóxico que comprende varios factores de estrés, entre ellos al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica.

25 Así, las cepas de levadura I-4264 e I-4265 según la invención tienen una cinética de producción de alcohol más rápida que la de la cepa de levadura de referencia I-4071 en medios de fermentación tóxicos que contienen vinaza (ver el ejemplo 2 y las figuras 5 y 6) y en medios de fermentación tóxicos que contienen melazas poco diluidas (ver el ejemplo 2 y las figuras 7 y 8).

30 Las cepas de levadura I-4264 e I-4265 presentan por tanto una verdadera ventaja industrial en el uso de fermentaciones alcohólicas en medios tóxicos. En efecto, la cinética de producción de alcohol más rápida permite obtener una productividad en volumen por hora más importante de las cubas de fermentación.

35 Además, otra ventaja de las cepas de levadura según la invención reside en la reducción de la duración de la fase de latencia durante una fermentación en un medio tóxico, lo que limita la contaminación del medio por otros microorganismos.

Un medio de fermentación tóxico es, por ejemplo, un medio que contiene 9% a 11% de no azúcares (con relación a la materia seca total del medio), siendo los no azúcares proporcionados por ejemplo por la vinaza y/o melaza.

Por “vinaza” se indica las aguas residuales de la destilación de los líquidos alcohólicos.

40 Los “no azúcares” comprenden sales minerales, moléculas orgánicas no consumidas durante una fermentación y moléculas orgánicas producidas durante una fermentación.

También se describe en esta memoria una cepa de levadura susceptible de obtenerse por el procedimiento tal como se ha definido anteriormente.

La cepa de levadura obtenida o susceptible de obtenerse por el procedimiento tal como se ha definido anteriormente es preferiblemente una cepa de levadura no modificada genéticamente.

45 También se describen en esta memoria todas las cepas derivadas de las cepas de levadura resistentes a un medio tóxico según la invención y que comparten las mismas propiedades.

50 Una cepa de levadura resistente a un medio tóxico según la invención es más concretamente una cepa destinada a la producción de levaduras utilizadas en destilería y/o en vinificación y/o en cervecería y/o para la producción de bebidas fermentadas y/o para la producción de alcohol industrial destinado por ejemplo a los biocombustibles o a las industrias químicas.

Una cepa de levadura resistente a un medio tóxico según la invención es preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*, en particular una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por tanto la presente invención tiene por objetivo una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada entre la cepa depositada en la CNCM con el número I-4264 y la cepa depositada en la CNCM con el número I-4265.

5 La cepa de levadura I-4264 se ha obtenido mediante cruce de cepas de levadura.

La cepa de levadura I-4264 produce una cantidad de alcohol en el instante t_{max} en un medio de selección tóxico superior o igual a 90% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} por dicha cepa en un medio de selección no tóxico, siendo la composición inicial de dicho medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica y siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y en el medio de selección no tóxico (ver el ejemplo 1).

La cepa de levadura I-4264 produce una cantidad de alcohol en el instante $t_{max,ref}$ en dicho medio de selección tóxico que se incrementa en al menos 50% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{max,ref}$ por la cepa de levadura número I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

15 La cepa de levadura I-4264 produce una cantidad máxima de alcohol, en un medio de selección no tóxico en azúcares no limitantes, superior o igual a 92% de la de la cepa número I-4071 en el mismo medio de selección no tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

La cepa de levadura I-4265 se ha obtenido por cruce de cepas de levadura.

20 La cepa de levadura I-4265 produce una cantidad de alcohol en el instante t_{max} en un medio de selección tóxico, superior o igual a 75% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} por dicha cepa en un medio de selección no tóxico, siendo la composición inicial de dicho medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica y siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y el medio de selección no tóxico (ver el ejemplo 1).

25 La cepa de levadura I-4265 produce una cantidad de alcohol en el instante $t_{max,ref}$ en dicho medio de selección tóxico que se incrementa en al menos 25% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{max,ref}$ por la cepa de levadura número I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

30 La cepa de levadura I-4265 produce una cantidad máxima de alcohol, en un medio de selección no tóxico en azúcares no limitantes, superior o igual a 92% de la de la cepa número I-4071 en el mismo medio de selección no tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

Por tanto la presente invención tiene por objetivo las dos cepas descritas anteriormente.

35 También se describe en esta memoria una cepa de levadura derivada de una cepa tal como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la cantidad de alcohol producido por dicha cepa derivada en el instante t_{max} en un medio de selección tóxico es superior o igual a 65% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{max} por dicha cepa en un medio de selección no tóxico, siendo la composición inicial del medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con la adición de al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica, y siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y el medio de selección no tóxico.

40 Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada tal como se ha definido anteriormente, se caracteriza por que su cantidad de alcohol producido en el instante $t_{max,ref}$ en dicho medio de selección tóxico es superior a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{max,ref}$ por la cepa de levadura número I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado.

45 Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada tal como se ha definido anteriormente, se caracteriza por que en un medio de selección no tóxico en el que el azúcar no es el factor limitante de la fermentación, su cantidad máxima de alcohol producido es superior o igual a 90% de la de la cepa número I-4071 en el mismo medio de selección no tóxico mencionado.

Por la expresión "cepa derivada" se indica una cepa derivada por cualquier transformación, sea cual fuere, como por ejemplo uno o varios cruces y/o una o varias mutaciones y/o una o varias transformaciones genéticas.

50 Una cepa derivada por cruce se puede obtener por cruce de una cepa según la invención con la misma cepa, u otra cepa según la invención, u otra cepa cualquiera.

Una cepa derivada por mutación puede ser una cepa que ha sufrido al menos una mutación espontánea en su genoma o al menos una mutación inducida, por ejemplo por mutagénesis. La o las mutaciones de la cepa derivada son silenciosas o no.

Una cepa derivada por transformación genética es una cepa en la que se ha introducido un ADN exógeno.

Dicho ADN exógeno puede proporcionarse mediante un plásmido.

Dicho ADN exógeno está preferiblemente integrado en el genoma de la levadura.

5 Una cepa derivada puede ser también un clon aislado a partir de un cultivo de una cepa de levadura según la invención.

Por tanto la presente invención tiene por objetivo las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* depositadas el 8 de diciembre de 2010 en virtud del tratado de Budapest en la CNCM (*Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia*) con los números I-4411 e I-4412.

10 La cepa de levadura I-4411 se ha obtenido por aislamiento de un clon a partir de un cultivo de la cepa I-4264.

15 La cepa de levadura I-4411 produce una cantidad de alcohol, en el instante t_{\max} en un medio de selección tóxico, superior o igual a 95% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} por la cepa en un medio de selección no tóxico, siendo la composición inicial de dicho medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica y siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y en el medio de selección no tóxico (ver el ejemplo 1).

Sorprendentemente, la cinética de producción de alcohol de la cepa de levadura I-4411 no se altera en un medio de selección tóxico con respecto al medio de selección no tóxico.

20 La cepa de levadura I-4411 produce una cantidad de alcohol en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en dicho medio de selección tóxico que se incrementa en al menos 12% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

La cepa de levadura I-4411 produce una cantidad de alcohol, en un medio de selección no tóxico en azúcares no limitantes, superior o igual a 95% de la de la cepa número I-4071 en el mismo medio de selección no tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

25 La cepa de levadura I-4412 se ha obtenido por aislamiento de un clon a partir de un cultivo de la cepa I-4264.

30 La cepa de levadura I-4412 produce una cantidad de alcohol, en el instante t_{\max} en un medio de selección tóxico, superior o igual a 72% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} por dicha cepa en un medio de selección no tóxico, siendo la composición inicial de dicho medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado en una concentración tóxica y siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y en el medio de selección no tóxico (ver el ejemplo 1).

La cepa de levadura I-4412 produce una cantidad de alcohol, en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en dicho medio de selección tóxico, superior o igual a 90% de la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

35 La cepa de levadura I-4412 produce una cantidad máxima de alcohol, en un medio de selección no tóxico en azúcares no limitantes, superior o igual a 95% de la de la cepa número I-4071 en el mismo medio de selección no tóxico mencionado (ver el ejemplo 1).

40 Además, las cepas de levadura I-4411 e I-4412 tienen una cinética de producción de alcohol más rápida que la de la cepa de levadura de referencia I-4071 en medios de fermentación tóxicos que contienen vinaza (ver el ejemplo 2 y la figura 9).

Las cepas de levadura I-4411 e I-4412 presentan por tanto una verdadera ventaja industrial en la utilización de fermentaciones alcohólicas en medios tóxicos.

45 También se describe en esta memoria un procedimiento de transformación de una cepa de levadura resistente a un medio tóxico, para obtener una cepa derivada tal como se ha definido anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento de transformación una etapa de transformación de dicha cepa por al menos un cruce y/o al menos una mutación y/o al menos una transformación genética.

La presente invención tiene por objetivo particularmente una levadura obtenida por cultivo de una cepa de levadura tal como se ha definido anteriormente.

Las levaduras según la invención son particularmente interesantes en las aplicaciones siguientes:

50 - alcohol llamado "de boca", destinado a la fabricación de bebidas alcohólicas, y/o

- alcohol industrial, destinado por ejemplo a los biocombustibles o a las industrias químicas.

Las levaduras se producen a partir de cepas de levadura resistentes a un medio tóxico según la invención, en particular como se describe en el libro de referencia "Tecnología de las Levaduras", 2ª edición, 1991, G. Reed y T.W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

5 La multiplicación de las levaduras, a escala industrial, comprende en general al menos las dos primeras etapas del conjunto de las etapas siguientes:

- multiplicación de una cepa de levadura en varios estadios, primero en semianaerobiosis, después en aerobiosis,

10 - separación por centrifugación de la levadura así producida de su medio de cultivo, para obtener una crema de levadura líquida que contiene aproximadamente entre 12 y 25% de materia seca, incluso una cantidad más elevada de materia seca si la crema de levadura se mezcla con productos osmolitos,

- filtración de la crema de levadura líquida así obtenida, en general sobre un filtro rotatorio a vacío, para obtener una levadura fresca deshidratada que contiene de 26% a 35% de materia seca,

- mezclar dicha levadura fresca deshidratada para obtener una masa homogénea,

15 - extrusión de la levadura así obtenida, para obtener

- una levadura prensada en forma de panes de levadura fresca o de levadura fresca desmenuzada, que contiene aproximadamente 30% de materia seca, o

- una levadura en forma de partículas, en general de gránulos, si la levadura se va a secar,

20 - eventualmente, secado de manera cuidadosa en una corriente de aire caliente, por ejemplo por fluidización, de las partículas de levaduras obtenidas por extrusión para obtener levadura seca.

La etapa de secado es preferiblemente un secado rápido controlado en presencia de un emulsionante.

Entre los emulsionantes que se pueden utilizar durante la etapa de secado se puede seleccionar monoestearato de sorbitán, utilizado por ejemplo a una concentración de aproximadamente 1,0% (en peso respecto al peso de levadura seca).

25 Las levaduras según la invención son levaduras resistentes a un medio tóxico.

Las levaduras según la invención se pueden utilizar en cualquier forma posible.

Por ejemplo, una levadura tal como se ha definido anteriormente se puede caracterizar por que está en forma de crema de levadura, levadura prensada, levadura seca o levadura congelada.

30 La presente invención tiene también por objetivo la utilización de una levadura tal como se ha definido anteriormente para la producción de alcohol.

La producción de alcohol se obtiene por fermentación alcohólica.

Las condiciones de fermentación alcohólica dependen del tipo de aplicación buscado, por ejemplo según se trate de una fermentación de tipo cervecera, vinificación o destilería.

El experto en la técnica sabe cómo determinar las condiciones apropiadas para una fermentación alcohólica.

35 El medio de fermentación alcohólica comprende los elementos siguientes: al menos una fuente de carbono fermentable, al menos una fuente de nitrógeno, al menos una fuente de azufre, al menos una fuente de fósforo, al menos una fuente de vitaminas y/o al menos una fuente de minerales.

La fuente de carbono se suministra, por ejemplo, en forma de un azúcar inmediatamente asimilable por la levadura, glicerol, etanol y/o una mezcla de éstos.

40 La fuente de carbono es preferiblemente un azúcar inmediatamente asimilable por la levadura, por ejemplo un azúcar simple de tipo glucosa o fructosa, o un disacárido de tipo sacarosa y/o una mezcla de estos azúcares.

El azúcar se puede suministrar en forma de jarabes de glucosa y/o jarabes de fructosa y/o hidrolizados de almidón y/o en forma de melazas y/o en forma de EP2 (*Egout Pauvre derivado de la 2ª cristalización del azúcar*) y/o en forma de una sustancia capaz de dar azúcares asimilables por la cepa de levadura y/o en forma de una mezcla de éstos.

La fuente de nitrógeno se suministra, por ejemplo, en forma de sulfato amónico, hidróxido amónico, fosfato diamónico, amoníaco, urea y/o una combinación de éstos. La fuente de azufre se suministra, por ejemplo, en forma de sulfato amónico, sulfato magnésico, ácido sulfúrico y/o una combinación de éstos.

5 La fuente de fósforo se suministra, por ejemplo, en forma de ácido fosfórico, fosfato potásico, fosfato diamónico, fosfato monoamónico, y/o una combinación de éstos.

La fuente de vitaminas se suministra, por ejemplo, en forma de melaza, hidrolizado de levadura, disolución de vitamina pura o de una mezcla de vitaminas puras y/o una combinación de éstos.

La fuente de vitaminas proporciona a la levadura todas las vitaminas en cantidades al menos equivalentes a las recomendadas en los libros de referencia. Se pueden asociar varias fuentes de vitaminas.

10 La fuente de minerales se suministra, por ejemplo, en forma de melaza, una mezcla de sales minerales y/o su combinación.

La fuente de minerales proporciona a la levadura todos los macroelementos y oligoelementos en cantidades al menos equivalentes a las recomendadas en los trabajos de referencia. Se pueden asociar varias fuentes de minerales. Una misma sustancia puede proporcionar varios elementos diferentes.

15 A modo de ejemplo, se puede hacer referencia a las condiciones de fermentación alcohólica descritas en el libro de referencia "Tecnología de las Levaduras", 2ª edición, 1991, G. Reed y T.W. 10 Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

En particular se describe en esta memoria la utilización de una levadura tal como se ha definido anteriormente para la producción de alcohol en un medio de fermentación tóxico.

20 Un procedimiento de producción de alcohol tal como se describe en esta memoria comprende generalmente una etapa de fermentación de al menos una levadura tal como se ha definido anteriormente, en un medio de fermentación.

El medio de fermentación es tal como se ha definido anteriormente.

25 El procedimiento de producción de alcohol tal como se ha definido anteriormente, se caracteriza por que dicho medio de fermentación es un medio de fermentación tóxico.

En particular, el procedimiento de producción de alcohol tal como se ha definido anteriormente se caracteriza por que dicho medio de fermentación tóxico comprende un agua reciclada y/o melaza.

Un agua reciclada es por ejemplo la vinaza, un agua de remojo de granos, flegmasa, un agua de condensación de los gases de fermentación, o un agua resultante de la concentración de vinaza.

30 El porcentaje de agua reciclada, vinaza y/o melaza en el medio de fermentación tóxico depende de las condiciones de fermentación.

El medio de fermentación comprende por ejemplo de 20% a 40% de vinaza.

El procedimiento de producción de tal alcohol comprende generalmente una etapa de reciclaje parcial o total del medio de fermentación.

35 El reciclaje del medio de fermentación puede realizarse de forma continua o en diferentes intervalos de tiempo durante la fermentación.

Durante un procedimiento de producción de alcohol de forma continua con cascada de fermentadores, el reciclaje del medio de fermentación se puede realizar en la o las primeras cubas de fermentación.

40 La presente invención se ilustrará a continuación por medio de los siguientes ejemplos que se dan a modo de ilustración y que no son en modo alguno limitativos. Los ejemplos describen en particular un procedimiento de selección de cepas de levadura según la invención, resistentes a un medio tóxico, y sus características.

Ejemplo 1: Selección de cepas de levadura resistentes a un medio tóxico

Materiales y métodos

1. Medios

45

Medio YEG			
Glucosa	20 g		
Extracto de levadura	5 g		
Agar	30 g		
Agua	cantidad suficiente para 1 l		
Medio de selección tóxico (azúcares limitantes)		Medio de selección no tóxico (azúcares limitantes)	
Glucosa	150 g	Glucosa	150 g
Extracto de levadura	5 g	Extracto de levadura	5 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,70	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,70
Acido acético	2,52 g	Acido cítrico	11,40 g
Acetato sódico	2,08 g	Citrato sódico	13,50 g
Acido cítrico	11,40 g	Vitaminas	
Citrato sódico	13,50 g	Sales minerales	
Vitaminas		Agua	cantidad suficiente para 1 kg
Sales minerales		pH 4,5	pH 4,5
Agua	cantidad suficiente para 1 kg		
pH 4,5			
Medio de aplicación sintético tóxico (azúcares no limitantes)		Medio de selección no tóxico (azúcares no limitantes)	
Dextrina	307,3 g	Glucosa	300 g
Extracto de levadura	5 g	Extracto de levadura	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	KH ₂ PO ₄	1 g
Urea	2,5 g	Urea	2,5 g
Acido cítrico	0,36 g	Acido cítrico	0,36 g
Citrato	0,53 g	Citrato	0,53 g
Acido acético	5 g	Acido acético	2,50 g
Vitaminas		Vitaminas	
Sales minerales		Sales minerales	
Agua	cantidad suficiente para 1 kg	Agua	cantidad suficiente para 1 kg
pH 4,5		pH 5,5	
+ amiloglucosidasa añadida extemporáneamente			
Medio de precultivo		Medio de esporulación	
Sacarosa	100 g	Acetato sódico	6,5 g
Extracto de levadura	20 g	Agar	15 g
Sales minerales		Agua	cantidad suficiente para 1 L
Agua	cantidad suficiente para 1 l	pH 6,5	

Todos los medios utilizados están esterilizados.

2. Cruce para la obtención de híbridos

- 5 Las cepas de levadura se ponen a esporular en el medio de esporulación durante 3 a 5 días a 30°C. Las células de levadura se recuperan en agua estéril. A continuación se digieren por una 13-glucanasa preparada extemporáneamente a 20 mg/ml, durante 30 min, a 30°C y con agitación.

Las células de levadura se extienden a continuación sobre un agar de medio YEG. Las esporas se disecan a continuación mediante un micromanipulador. Las esporas se cultivan a 30°C durante 2 horas.

- 10 Las esporas de las cepas parentales se mezclan sobre un agar de medio YEG. La hibridación se realiza durante 3 a 5 días a 30°C. Las mezclas se extienden a continuación sobre un agar de medio YEG. Después de 48 h de incubación a 30°C, aparecen colonias y se realizan PCR sobre estas colonias para identificar los híbridos (Huxley et al., 1990).

3. Fermentación

Las células de levadura se precultivan en 10 ml de medio de precultivo ajustado a pH 4,7 durante 24 h a 30°C.

- 15 Se inoculan 2 ml de este precultivo en 200 ml de medio de precultivo durante 20 h a 26°C con agitación.

A continuación las células de levadura se recuperan por centrifugación durante 5 min a 4500 rpm y a 4°C. Las células de levadura se lavan con agua fría y se centrifugan de nuevo en las mismas condiciones. Las células de levadura se recuperan en 40 ml de agua fría. Se mide la materia seca obtenida.

La fermentación se realiza a 32°C, en ausencia de aireación, con agitación (95 rpm).

El medio de fermentación (medio de selección tóxico o medio de selección no tóxico) se siembra con 0,125 g de levaduras (en equivalente de materia seca) por kg de medio.

4. Medida de la cantidad de alcohol producido – Método directo

- 5 La cantidad de etanol se determina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) 15 (Shimadzu®) utilizando una columna Aminex HPX 87H (Biorad®), resina intercambiadora de protones, eluida por una disolución de ácido sulfúrico 5 mM.

5. Evaluación de la cantidad de alcohol producido – Método indirecto

- 10 Al estar la cantidad de alcohol producido correlacionada con la pérdida de masa del medio de fermentación, la cantidad de alcohol producido se evalúa por la pérdida de masa del medio de fermentación. Tras el cálculo, se obtiene la cantidad de alcohol producido (en g/kg de medio inicial).

Resultados

1. Cruce

Varias cepas de levadura de la colección de cultivo del Solicitante se utilizan como cepas parentales para los cruces.

- 15 2. Preselección de los híbridos sobre la cantidad máxima de alcohol producido en un medio de selección no tóxico

Entre los híbridos obtenidos en la etapa de cruce, se prueban después 59 híbridos sobre la base de la concentración máxima de alcohol producido en un medio de selección no tóxico, en condiciones de azúcar no limitante.

La figura 1 muestra la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico (en g/kg) al final de la fermentación para los 13 híbridos mejores.

- 20 La cantidad final de alcohol producido por los híbridos se compara con la de la cepa de referencia I-4071 (denominada T en la figura 1).

Se preseleccionan los híbridos cuya cantidad máxima de alcohol producido es superior o igual a 92% de la de la cepa de referencia I-4071. Se trata de los híbridos 1, 2, 4, 8 y 11.

- 25 3. Selección de los híbridos basada en su cinética de producción de alcohol en un medio de selección tóxico con relación a un medio de selección no tóxico

Los híbridos 1, 2, 4 y 8 se prueban a continuación sobre la base de su cinética de producción de alcohol en el medio de selección tóxico con relación al medio de selección no tóxico. Los resultados se presentan en la figura 2 para los híbridos 1, 2, 8 y 11.

Al presentar el híbrido 4 un problema de crecimiento en el medio de selección tóxico, no se representa en la figura 2.

- 30 En su instante t_{max} , el híbrido 1 produce una cantidad de alcohol en el medio de selección tóxico que es superior o igual a 90% de la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico.

En su instante t_{max} , el híbrido 2 produce una cantidad de alcohol en el medio de selección tóxico que es superior o igual a 75% de la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico.

- 35 En su instante t_{max} , el híbrido 8 produce una cantidad de alcohol en el medio de selección tóxico que es superior o igual a 70% de la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico.

En su instante t_{max} , el híbrido 11 produce una cantidad de alcohol en el medio de selección tóxico que es superior o igual a 65% de la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico.

Por comparación, en su instante t_{max} , la cepa de levadura de referencia I-4071 produce una cantidad de alcohol en el medio de selección igual a 60% de la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico.

- 40 Los híbridos 1, 2, 8 y 11 se seleccionan durante esta etapa.

4. Selección de los híbridos basada en su cinética de producción de alcohol en un medio de selección tóxico con relación a la cepa de referencia I-4071

Los híbridos 1, 2, 8 y 11 se prueban después en fermentación en el medio de selección tóxico con relación a la cepa de levadura de referencia I-4071.

La figura 3 muestra que la cinética de producción de alcohol de los híbridos 1, 2 y 8 es más rápida que la de la cepa I-4071.

La cinética de producción de alcohol del híbrido 11 es próxima a la de la cepa de referencia I-4071.

5 Además, el híbrido 1 produce una cantidad de alcohol en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio de selección tóxico que se incrementa en el menos 50% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en este medio de selección tóxico.

Con respecto al híbrido 2, éste produce una cantidad de alcohol en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio de selección tóxico que se incrementa en al menos 25% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en este medio de selección tóxico.

10 En lo que respecta al híbrido 8, éste produce una cantidad de alcohol en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio de selección tóxico que se incrementa en al menos 20% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en este medio de selección tóxico.

15 La resistencia de los híbridos 1, 2, 8 y 11 se prueba entonces en el medio de aplicación sintético tóxico que presenta una toxicidad más alta ligada al ácido acético (5 g/kg a pH 4,5) y que presenta además una toxicidad ligada al alcohol, ya que el azúcar se añade en cantidad no limitante de la fermentación.

El azúcar se proporciona en forma de dextrinas para evitar un estrés osmótico ligado al azúcar.

Como se indica en la figura 4, solo las cepas de levadura I-4264 e I-4265 han mostrado una ventaja cinética con respecto a la cepa de levadura de referencia I-4071 en este medio de aplicación sintético tóxico.

20 En conclusión, los híbridos 1 y 2 tienen una ventaja cinética sobre la cepa de referencia I-4071 durante la producción de alcohol en el medio de selección sintético tóxico. Los híbridos 1 y 2 corresponden respectivamente a la cepa de levadura I-4264 e I-4265 según la invención.

5. Aislamiento de clones a partir de un cultivo de la cepa de levadura I-4264

Se realiza un cultivo de la cepa de levadura I-4264 en el medio YEG.

25 Después se lleva a cabo una extensión sobre el plato de cultivo. Se seleccionan varios clones y se evalúa su cinética de producción de alcohol, así como la cantidad máxima de alcohol producida en el medio de selección no tóxico en azúcares no limitantes.

Los resultados obtenidos concernientes a los clones A y C se indican en la tabla 1

Tabla 1

Clon	Cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} en el medio tóxico/medio no tóxico (azúcares limitantes)	Cantidad de alcohol producido con relación a la cepa I-407 en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio tóxico (azúcares imitantes)	Cantidad máxima de alcohol producido en el medio de selección no tóxico con relación a la cepa I-4071 (azúcares no limitantes)
Clon A	99%	+15%	98,6%
Clon C	76%	-10%	98,7%

30 Los clones A y C tienen una cantidad máxima de alcohol producido superior o igual al 95% de la de la cepa de referencia I-4071 en un medio de selección no tóxico, en condiciones de azúcares no limitantes.

En su instante t_{\max} , el clon A produce una cantidad de alcohol en el medio de selección tóxico que es superior o igual a 95% de la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico (en azúcares limitantes).

35 En su instante t_{\max} , el clon C produce una cantidad de alcohol en el medio de selección tóxico que es superior o igual a 72% de la cantidad de alcohol producido en el medio de selección no tóxico (en azúcares limitantes).

Los clones se evalúan después en fermentación en el medio de selección tóxico (en azúcares limitantes) con relación a la cepa de levadura de referencia I-4071.

40 La cinética de producción de alcohol del clon A es más rápida que la de la cepa I-4071. El clon A produce así una cantidad de alcohol en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio de selección tóxico que se incrementa en al menos 12% con relación a la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en este medio de selección tóxico. El clon A presenta una verdadera ventaja cinética sobre la cepa de referencia I-4071 durante la producción de alcohol en el medio de selección sintético tóxico.

La cinética de producción de alcohol del clon C es ligeramente menor con respecto a la de la cepa de referencia I-4071.

5 El clon C produce una cantidad de alcohol en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio de selección tóxico superior o igual a 90% de la cantidad de alcohol producida en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de levadura número I-4071 en este medio de selección tóxico.

Los clones A y C corresponden respectivamente a las cepas de levadura I-4411 e I-4412.

Ejemplo 2: Utilización de las cepas de levadura según la invención en medio de aplicación tóxico

Material y métodos

1. Medios

	Medio A		Medio B
- EP2 de remolacha	416,2 g	- EP2 de remolacha	373,1 g
- vinaza	118,1 g	- vinaza	572,9 g
- urea	1,6 g	- urea	1,6 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O al 9,5%	0,1 g	- MgSO ₄ 7H ₂ O al 9,5%	0,1 g
- H ₃ PO ₄ al 75%	0,5 g	- H ₃ PO ₄ al 75%	0,5 g
- agua	cantidad suficiente para 1 kg	- Bifluoruro amónico al 3,5%	1,4 g
- pH inicial 5		- agua	cantidad suficiente para 1 kg
		- pH inicial 5	
	Medio C		Medio D
- Melaza de remolacha	394,7 g	- Melaza de caña	315,2 g
- (NH ₄) ₂ HPO ₄	4,7 g	- glucosa	68,4 g
- vitaminas		- (NH ₄) ₂ HPO ₄	4,7 g
- agua	cantidad suficiente para 1 kg	- vitaminas	
- pH inicial 5,3		- agua	cantidad suficiente para 1 kg
		- pH inicial 5,3	
	Medio E		
- EP2 de remolacha	353,1 g		
- vinaza	413,2 g		
- urea	0,39 g		
- (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,13 g		
- magnesio y zinc			
- agua de proceso*	233,6 g		
- pH inicial 5			
*mezcla que comprende agua procedente de los ciclos de limpieza, de los condensados de fermentación y de destilación.			

10 El medio A contiene 9% de no azúcares (con relación a la materia seca total del medio), siendo los no azúcares en su mayor parte proporcionados por la vinaza.

El medio B contiene 9% de no azúcares (con relación a la materia seca total del medio), siendo los no azúcares en su mayor parte proporcionados por la vinaza.

15 El medio C contiene 10,8% de no azúcares (con relación a la materia seca total del medio), siendo los no azúcares proporcionados por la melaza (EP3) de remolacha que se diluye débilmente.

El medio D contiene 10,8% de no azúcares (con relación a la materia seca total del medio), siendo los no azúcares proporcionados por la melaza (EP3) de caña que se diluye débilmente.

20 El medio E contiene 11% de no azúcares (con relación a la materia seca total del medio), siendo los no azúcares en su mayor parte proporcionados por la vinaza.

2. Fermentación y medida del alcohol

Las condiciones de fermentación son las mismas que en el ejemplo 1, excepto que el medio de fermentación contiene azúcar en cantidad no limitante.

La cantidad de alcohol producido se mide por pérdida de peso, como se detalla en el ejemplo 1.

25 Resultados

Los híbridos 1 y 2 seleccionados y que corresponden respectivamente a las cepas de levadura I-4264 e I-4265 se prueban después en medios de aplicación tóxicos.

Los medios de aplicación tóxicos probados son los siguientes:

- los medios A y B que contienen una cantidad importante de vinaza, y
- 5 - los medios C y D que contienen melaza débilmente diluida, de remolacha y de caña respectivamente.

Los clones A y C correspondientes respectivamente a las cepas de levadura I-4411 e I-4412 se prueban en el medio de aplicación tóxico E.

Las figuras 5 a 8 muestran la cinética de producción de alcohol de las cepas de levadura I-4264 e I-4265 según la invención y de la cepa de referencia I-4071, en los medios A, B, C y D, respectivamente.

- 10 La figura 9 muestra la cinética de producción de alcohol de las cepas de levadura I-4411 e I-4412 y de la cepa de referencia I-4071 en el medio de aplicación tóxico E.

15 Como se indica en la figura 5, la cinética de producción de alcohol de las cepas de levadura I-4264 e I-4265 según la invención es más rápida que la de la cepa de referencia I-4071 después de 20 h de fermentación. La diferencia entre la cantidad de alcohol producido por los híbridos y la cantidad de alcohol producido por la cepa de referencia se acentúa a partir de 20 h hasta el final de la fermentación.

20 Como se indica en la figura 6, la cinética de producción de alcohol de las cepas de levadura I-4264 e I-4265 es más rápida que la de la cepa de referencia I-4071, después de 20 h de fermentación y después de 30 horas de fermentación respectivamente. La fase de latencia de la cepa I-4264 es muy corta en comparación con las otras 2 cepas. La diferencia entre la cantidad de alcohol producido por los híbridos y la cantidad de alcohol producido por la cepa de referencia aumenta a partir de 20 h y 30 h respectivamente hasta el final de la fermentación.

Como se indica en las figuras 7 y 8, la cinética de producción de alcohol de las cepas de levadura I-4264 e I-4265 es más rápida que la de la cepa de referencia I-4071 durante todo el tiempo de fermentación.

Como se indica en la figura 9, la cinética de producción de alcohol de las cepas de levadura I-4411 e I-4412 es más rápida que la de la cepa de referencia I-4071 durante todo el tiempo de fermentación en el medio de aplicación E.

- 25 En conclusión, la cepa de referencia I-4071 está más afectada por la toxicidad de los medios de aplicación probados que las cepas de levadura I-4264, I-4265, I-4411 e I-4412 según la invención.

Las cepas de levadura I-4264, I-4265, I-4411 e I-4412 según la invención proporcionan una ventaja cinética para la producción de alcohol en medio tóxico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de selección de una cepa de levadura resistente a un medio tóxico que comprende:
- 5 - una etapa de preselección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad máxima de alcohol producido, en un medio de selección no tóxico en condiciones de azúcar no limitante, es superior o igual a 92% de la cantidad máxima de alcohol producido, en el medio de selección no tóxico, por la cepa de referencia depositada el 4 de septiembre de 2008 en la CNCM con el número I-4071.
 - 10 - una etapa de fermentación, en un medio de selección tóxico y en un medio de selección no tóxico, de al menos una cepa de levadura preseleccionada,
 - siendo la composición inicial del medio de selección tóxico la composición inicial del medio de selección no tóxico con adición de al menos un ácido orgánico no ionizado seleccionado entre ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido levulínico o una mezcla de éstos, y
 - siendo el azúcar el factor limitante de la fermentación en el medio de selección tóxico y en el medio de selección no tóxico,
 - 15 en donde la concentración del ácido orgánico no ionizado en el medio de selección tóxico es una concentración que conlleva una disminución de la cantidad de alcohol producido en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ por la cepa de referencia número I-4071 de 25% a 75%, preferiblemente una disminución de 40% a 75%, con relación a la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa de referencia número I-4071 en el instante $t_{\max \text{ ref}}$ en el medio de selección no tóxico, en donde el instante $t_{\max \text{ ref}}$ es el instante en el que se alcanza la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa de referencia número I-4071 en el medio de selección no tóxico,
 - 20 - una etapa de selección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} en el medio de selección tóxico es superior o igual a 65% de la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} por dicha cepa en el medio de selección no tóxico, en donde el instante t_{\max} es el instante en el que se alcanza la cantidad máxima de alcohol producido por dicha cepa de levadura en el medio de selección no tóxico, y
 - 25 - una etapa suplementaria de selección de al menos una cepa de levadura cuya cantidad de alcohol producido, en el instante t_{\max} en dicho medio de selección tóxico, es superior a la cantidad de alcohol producido en el instante t_{\max} por la cepa de levadura de referencia I-4071 en el mismo medio de selección tóxico mencionado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el medio de selección tóxico y el medio de selección no tóxico son medios sintéticos.
- 30 3. Cepa de levadura obtenida por el procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y seleccionada entre la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM con el número I-4264, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM con el número I-4265, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM con el número I-4411 y la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM con el número I-4412.
- 35 4. Levadura obtenida por cultivo de una cepa de levadura según la reivindicación 3.
5. Utilización de una levadura según la reivindicación 4, para la producción de alcohol.
6. Procedimiento de producción de alcohol que comprende una etapa de fermentación de al menos una levadura según la reivindicación 4 en un medio de fermentación.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho medio de fermentación es un medio de fermentación tóxico.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho medio de fermentación tóxico comprende un agua reciclada y/o melaza.
9. Procedimiento según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que comprende una etapa de reciclaje parcial o total del medio de fermentación.

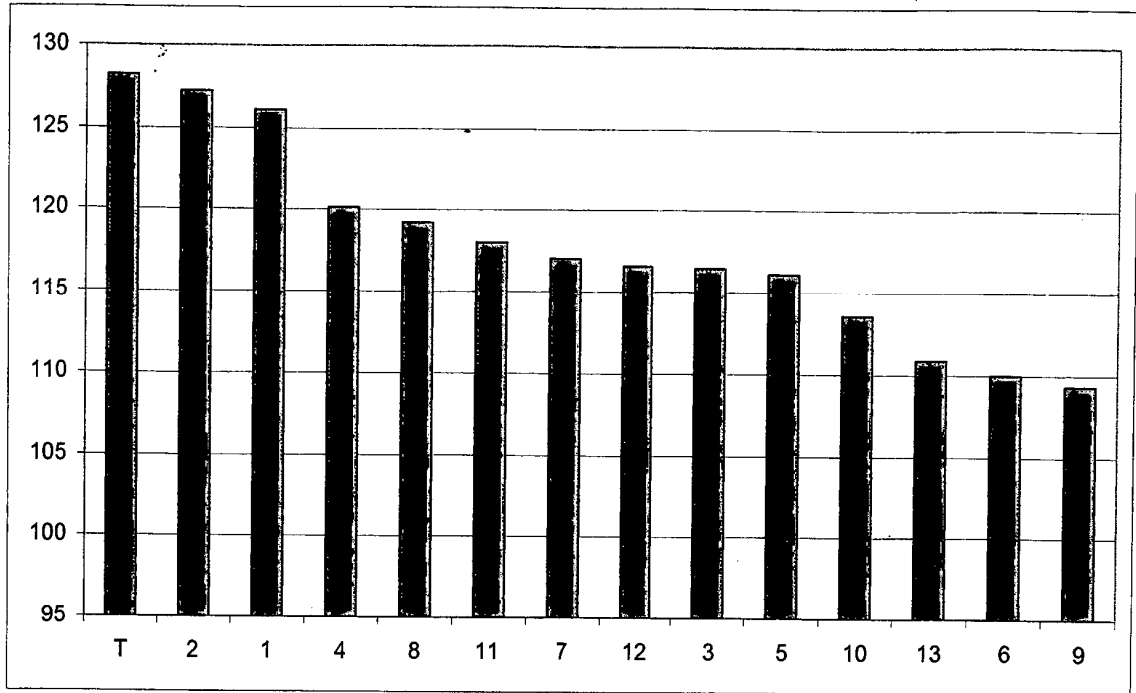


Figura 1

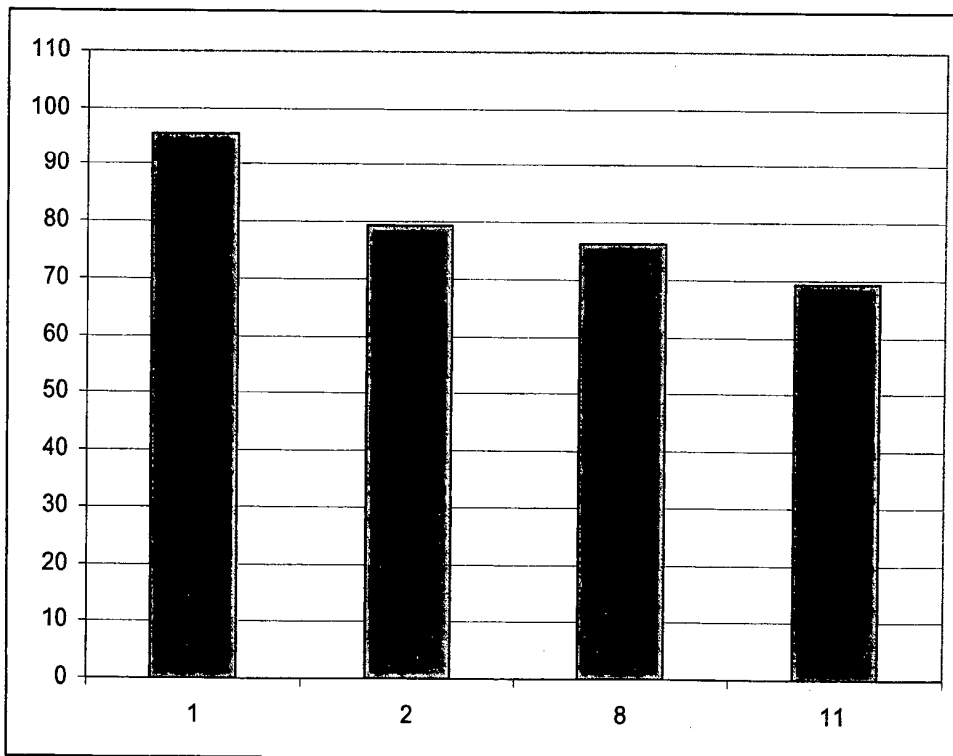


Figura 2

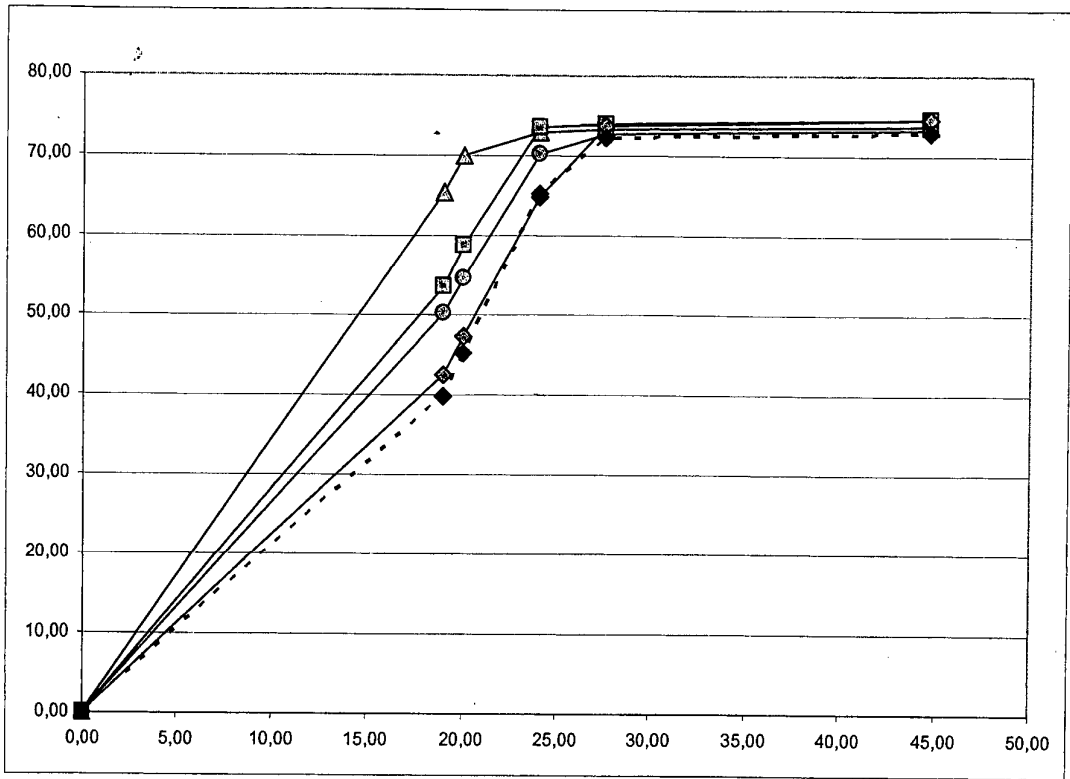


Figura 3

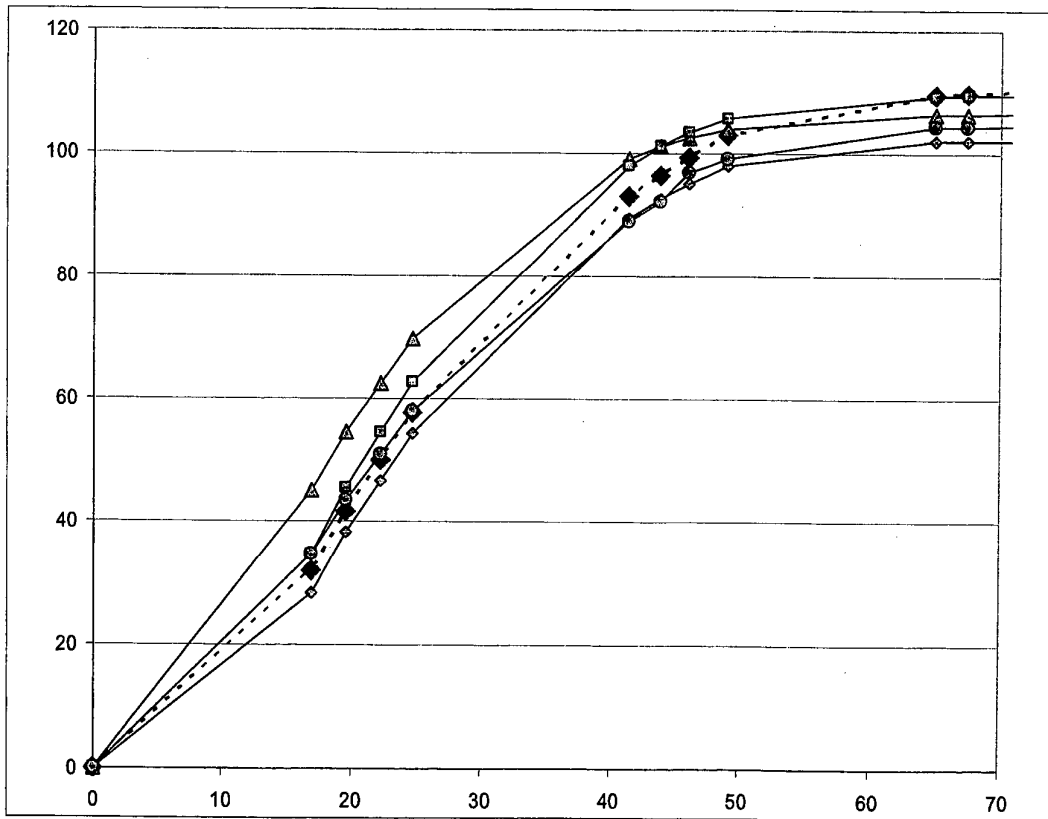


Figura 4

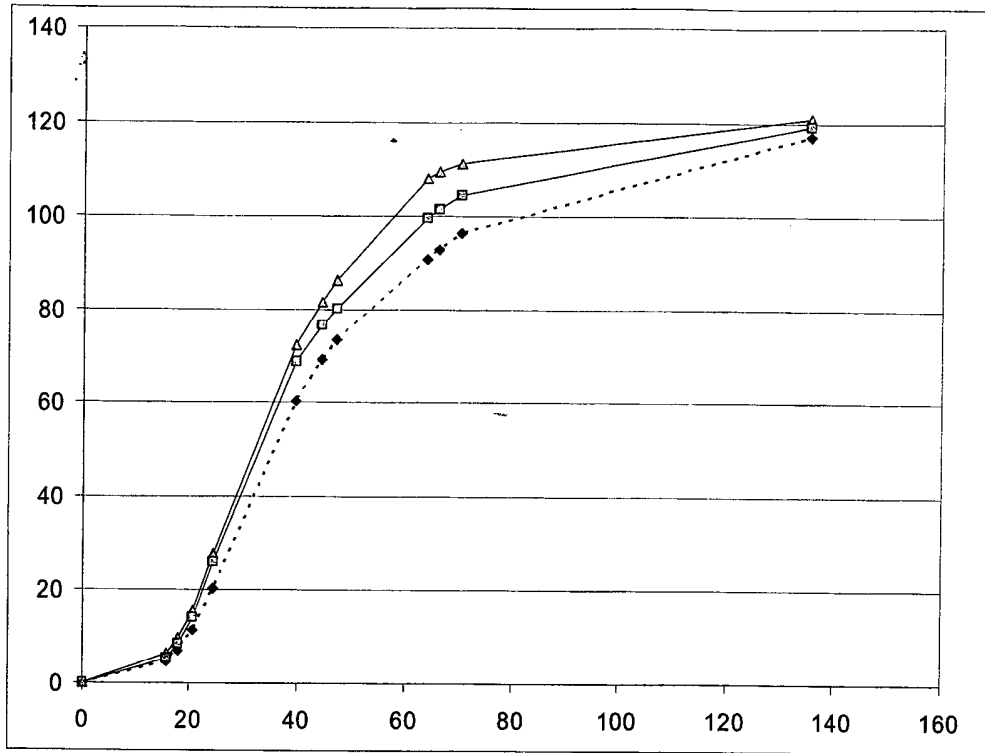


Figura 5

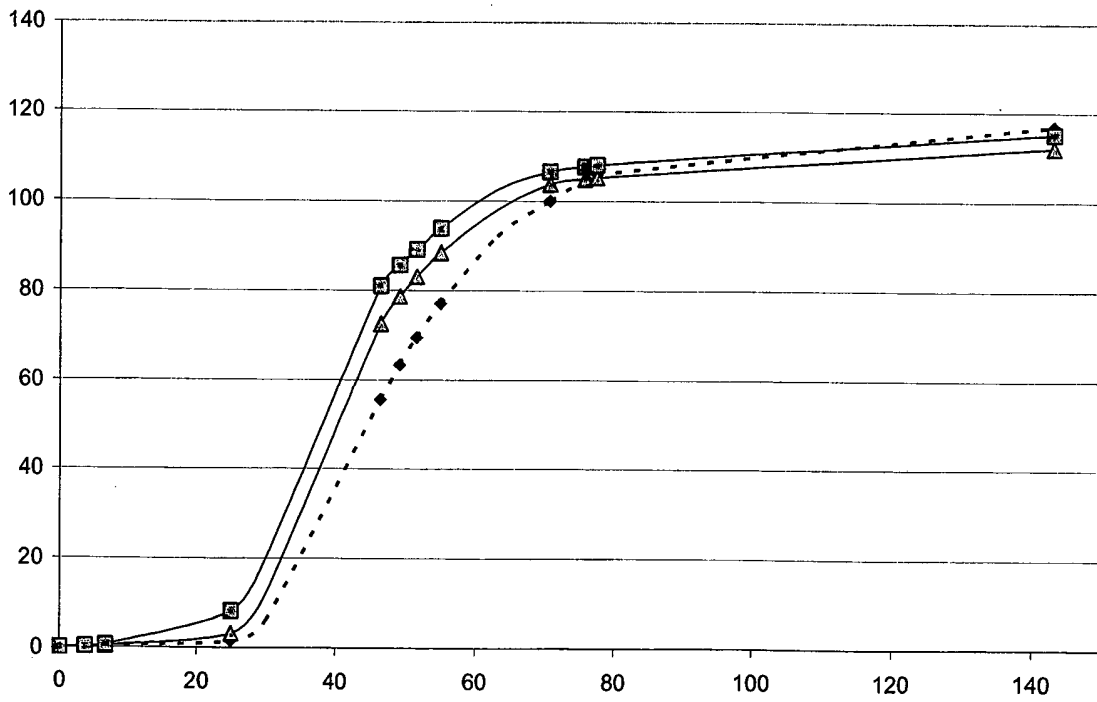


Figura 6

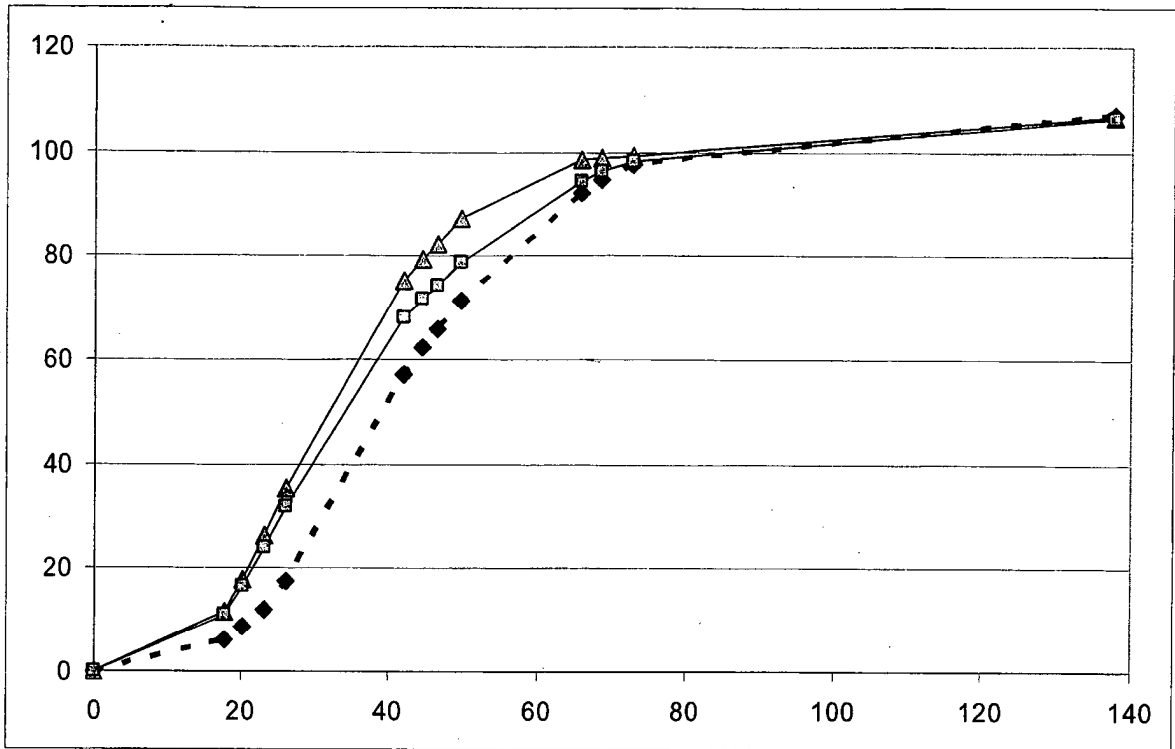


Figura 7

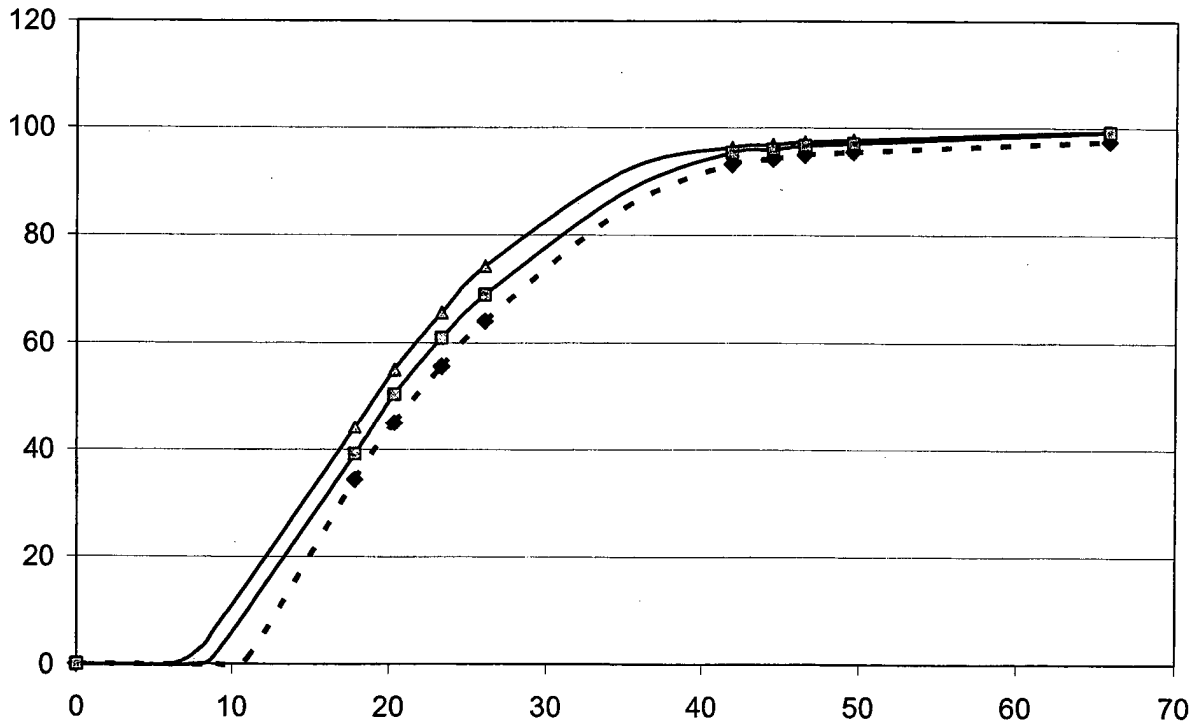


Figura 8

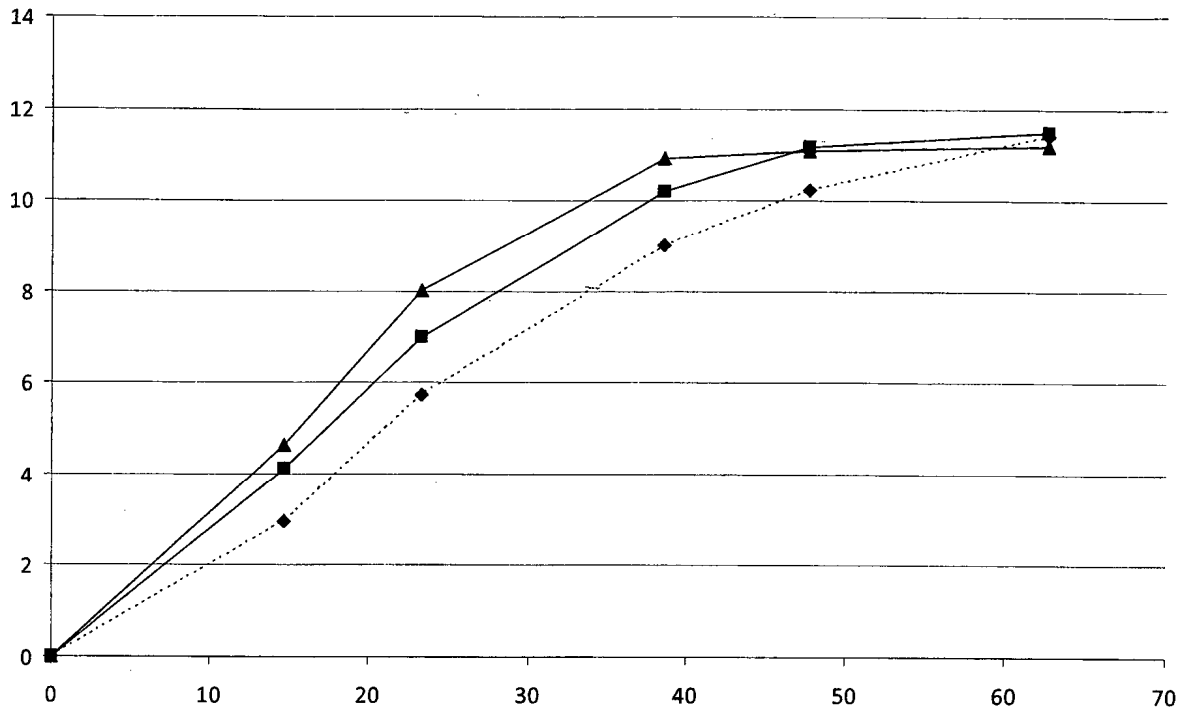


Figura 9