

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 269**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2014 PCT/FR2014/053575**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15101753**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2014 E 14831040 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 3090042**

54 Título: **Cepas de levadura para la producción de etanol de primera generación**

30 Prioridad:

30.12.2013 FR 1363672

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

29.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAVOUZET, JEAN-MICHEL;
QUIPOURT, ANNE-DOMINIQUE y
TBAIKHI, ANNIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 648 269 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepas de levadura para la producción de etanol de primera generación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a cepas de levadura productoras de etanol de primera generación, a levaduras obtenidas cultivando estas cepas y a métodos para la producción industrial de etanol a partir de dichas levaduras. Más específicamente, la presente invención se refiere a tres cepas específicas que presentan una fuerte tolerancia al etanol, menor producción de glicerol que las cepas de mayor rendimiento utilizadas hoy en día en los procesos de producción de etanol y un rendimiento elevado en etanol. Las cepas de la invención también disponen de una cinética de producción rápida de etanol.

Contexto de la invención

10 La disminución de los recursos energéticos no renovables y la creciente preocupación por el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero están en el origen de la necesidad de encontrar fuentes de energía alternativas a los combustibles fósiles (petróleo, carbón, gas). La biomasa vegetal de los bosques, los productos y/o coproductos agrícolas y agroalimentarios constituye una fuente de carbono considerable para la producción de moléculas de interés industrial. El etanol producido a partir de azúcares fermentables contenidos en las plantas se usa en vehículos equipados con motores de combustión. La producción de bioetanol ha conocido de este modo un desarrollo rápido en los últimos años en América del Norte y Europa. En 2008, se han producido más de 56 mil millones de litros de etanol en el mundo a partir de biomasa vegetal.

15 El bioetanol primera generación se produce por la fermentación de hexosas (azúcares de seis carbonos) contenidos en las biomásas ricas en almidón (granos de maíz, cebada, trigo, yuca, tubérculos de patata, etc.) o sacarosa (caña azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce etc.), mientras que el bioetanol de segunda generación se produce por transformación de la celulosa y la hemicelulosa contenidas en residuos agrícolas tales como la paja de cereales, las cañas del maíz, residuos de forestales, la madera, los cultivos energéticos como el pasto varilla o monte bajo de corta o muy corta rotación (álamo, por ejemplo).

20 Los procesos para obtener medios de fermentación ricos en azúcares de procesos de primera generación son relativamente simples y están bien controlados. En el caso de las plantas de azucareras, tales como la caña de azúcar, el sorgo dulce, la remolacha azucarera, la planta se tritura o se corta en trozos y se obtiene un jugo azucarado directamente o después de la inmersión en agua. La fermentación alcohólica puede tener lugar a partir del jugo en bruto obtenido, a partir de jugo concentrado o jugos concentrados tales como melazas obtenidas después de la extracción de una fracción de los azúcares inicialmente presentes. En el caso de las fracciones vegetales ricas en almidón, tales como los granos de maíz, el almidón en primer lugar debe hidrolizarse a glucosa, que entonces la levadura puede convertir en etanol. El proceso típico de hidrólisis consiste en una primera fase en el curso de la cual las cadenas de almidón se convierten en cadenas más cortas por la acción de una alfa-amilasa seguida de una etapa de fermentación denominada SSF (sacarificación y fermentación simultáneas) en el curso de la cual las dextrinas se hidrolizan por adición de glucosidasas y en el curso de la cual la glucosa es fermentada a etanol por la levadura. Determinados procesos, conocidos como procesos en frío, producen una hidrólisis de almidón reducida o incluso nula antes de la etapa de fermentación. En el caso del etanol de segunda generación producido a partir de material lignocelulósico, los procesos de hidrólisis química y enzimática son mucho más complejos y laboriosos debido a que el material lignocelulósico está formado por una matriz rígida difícil de desestructurar para liberar la celulosa y la hemicelulosa de la lignina. La hidrólisis de materiales lignocelulósicos genera hidrolizados que contienen hexosas y/o pentosas. Cualquiera que sea la biomasa utilizada o el producto empleado, el producto final es el mismo, sólo difiere el proceso de fabricación.

25 En Europa, la remolacha azucarera y los cereales (trigo, cebada, maíz) son los principales recursos utilizados para la producción de etanol de origen agrícola. Los azúcares (glucosa, fructosa o sacarosa) contenidos en las plantas azucareras (remolacha azucarera, caña de azúcar) y las plantas amiláceas (cereales como el trigo o el maíz) se convierten en alcohol mediante un proceso de fermentación industrial que utiliza levaduras. El alcohol luego se destila y deshidrata para obtener bioetanol. Los coproductos obtenidos durante el proceso de producción (residuos y pulpa) se destinan a la alimentación animal.

30 Las levaduras utilizadas por los productores de etanol de primera generación son principalmente levaduras especializadas que permiten optimizar la rentabilidad del proceso de producción. Estas levaduras son entre otras: Ethanol Red[®] (Fermentis[®]) Thermosacc[®] (Lallemand[®]), Angel Super Alcohol[®] (Angel[®]) y Fall[®] (AB Mauri[®]). Las cualidades esperadas de estas levaduras son su capacidad para producir rápidamente altas concentraciones de etanol y agotar los azúcares de los medios de fermentación en intervalos de temperatura y pH representativos de las condiciones industriales. Estas cualidades son especialmente buscadas en procesos que utilizan cereales, maíz en particular, que generan hidrolizados con altas concentraciones de azúcares. En efecto, los productores ajustan el contenido de azúcar de su medio de fermentación de manera que sea lo más alto posible, a la vez que aseguran que el azúcar se convierte lo más rápida y completamente posible en etanol. De la misma manera que el productor desea que la levadura convierta todos los azúcares del medio en etanol, el productor desea que el rendimiento

global de conversión de los azúcares consumidos en etanol sea el más elevado posible y en consecuencia que se generen la menor cantidad posible de coproductos tales como el glicerol en el curso de la fermentación.

5 Disponer de una levadura que presenta una mayor tolerancia al etanol, disponer de una levadura que produce menos glicerol a la vez que asegura una productividad volumétrica equivalente o superior tanto en condiciones de fermentación habituales como en las fluctuaciones de parámetros de fermentación permitiría a los productores de etanol aumentar la rentabilidad de su instalación aumentando la producción de etanol. Hay pues siempre una necesidad de disponer de nuevas cepas de levadura mejoradas para la producción de etanol de primera generación.

Compendio de la invención

10 La presente invención se refiere a cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que presentan propiedades mejoradas en comparación con cepas de levadura especializadas habitualmente utilizadas en la producción de etanol de primera generación.

15 Así, en particular, la presente invención tiene por objeto la cepa de levadura 53-137 de *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes del Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, Cedex 15) con el número I-4791 en las condiciones del tratado de Budapest.

La presente invención tiene también por objeto la cepa de levadura 53-005 de *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 a la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes del Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, Cedex 15) con el número I-4790 en las condiciones del Tratado de Budapest.

20 La presente invención asimismo tiene también por objeto la cepa de levadura 53-214 de *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 a la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes del Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, Cedex 15) con el número I-4792 en las condiciones del Tratado de Budapest.

25 La presente invención también se refiere a una levadura obtenida por cultivo de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada entre la cepa de levadura *Saccharomyces*, que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4791, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4790 y la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4792.

30 La presente invención también tiene por objeto la utilización de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada entre la cepa de levadura *Saccharomyces*, que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4791, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4790 y la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4792 o una levadura obtenida por cultivo de una de estas cepas, para la producción de etanol de primera generación a partir de biomasa.

35 La presente invención tiene por objeto también un proceso de producción de etanol de primera generación a partir de biomasa que comprende una etapa de fermentación que utiliza una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada entre la cepa de levadura *Saccharomyces* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4791, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4790 y la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se ha depositado el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4792 o una levadura obtenida por cultivo de una de estas cepas.

En algunas realizaciones, la biomasa es rica en azúcar y/o almidón y se selecciona entre, o proviene principalmente de maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, yuca, triticale, patata, boniato, caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo azucarero.

45 En algunas realizaciones preferidas, la biomasa se selecciona entre o proviene del maíz, trigo, cebada, yuca, remolacha azucarera, caña de azúcar.

La presente invención tiene por objeto también la fabricación de residuos y residuos que contienen sustancias solubles de residuos de fermentación obtenidos durante los procesos de producción de etanol.

A continuación se proporciona una descripción más detallada de algunas realizaciones preferidas de la invención.

Descripción detallada de la invención

50 Como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a tres cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* útiles para la producción de etanol de primera generación. Las tres cepas de la invención se obtuvieron mediante un programa de hibridación y selección. Son el resultado de la hibridación entre la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM el 4 de septiembre de 2008 con el número I-4072, una cepa

pertenece al solicitante, y descrita en el documento WO2010/031916 y el clon de levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositado en la CNCM el 26 de junio, 2013 con el número I-4782, que también pertenece al solicitante.

La cepa de levadura I-4072 es una cepa seleccionada por el solicitante por que tiene la mayor tolerancia al etanol en un grupo de 21 cepas evaluadas.

- 5 El solicitante ha seleccionado el clon de levadura *Saccharomyces cerevisiae* I-4782 por que tiene una alta tolerancia al etanol, aunque menor que la de la cepa I-4072, pero con una producción de glicerol menor que la cepa I-4072.

El programa de selección de híbridos condujo a las tres cepas de la invención. Cada una de estas cepas constituye una alternativa a las cepas especializadas de mejores rendimientos que se utilizan actualmente en la producción industrial de etanol de primera generación. En efecto, las tres cepas de la invención presentan una mayor tolerancia a etanol que la cepa de referencia I-4072 y al mismo tiempo producen etanol de primera generación con un rendimiento más elevado que la cepa I-4072 debido a una menor producción de glicerol, que es un subproducto de la reacción de fermentación. Esta buena tolerancia se observa independientemente de la temperatura (32°C, 35°C o 38°C), el pH (4,0, 5,0 o 5,5) y el suministro de nitrógeno mineral (150 a 500 ppm) durante la fermentación, lo que los hace especialmente adaptadas para la producción de etanol de primera generación donde las fluctuaciones en los parámetros de fermentación son corrientes. Además, las cepas de la invención tienen la ventaja de tener una cinética de producción de etanol que es similar o ligeramente menor que la de la cepa de referencia I-4072.

La invención también se refiere a una levadura obtenida cultivando una de las cepas de la invención. Los procedimientos de cultivo de una cepa de levadura son conocidos en la técnica, y un experto en la técnica sabe cómo optimizar las condiciones de cultivo para cada cepa en función de su naturaleza.

20 Las cepas de levadura de la invención y las levaduras obtenidas por cultivo de estas cepas encuentran aplicación en la producción de etanol de primera generación a partir de biomasa. En la presente memoria, se entiende por "biomasa" el conjunto de materias orgánicas de origen vegetal que puede convertirse en fuente de energía después de su transformación. Preferiblemente, en el contexto de la invención, la biomasa es el resultado de productos y/o coproductos agrícolas o agroalimentarios. En particular, la biomasa es preferiblemente rica en sacarosa o en almidón, y se selecciona entre, o procede de, por ejemplo, el maíz, el trigo, la cebada, el centeno, el sorgo, la yuca, el triticale, la patata, la batata, la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el sorgo azucarero.

En algunas realizaciones preferidas, la biomasa se selecciona entre, o procede del maíz, el trigo, la cebada o la yuca.

30 Los procedimientos para la producción de etanol de primera generación a partir de biomasa y la utilización de levaduras en la etapa de fermentación son conocidos en la técnica. El proceso industrial más común recurre a tratamientos físicos, químicos y bioquímicos que en última instancia apuntan a permitir la fermentación de azúcares y a producir etanol. Existen diversas variantes de este proceso que son conocidas por los expertos en la técnica. Las cepas de levadura de la invención y las levaduras obtenidas cultivando estas cepas pueden emplearse en cualquier método de producción de etanol de primera generación.

35 La invención se aplica especialmente a la producción de etanol como carburante, pero también a la producción de etanol para las industrias alimentarias, químicas, farmacéuticas y cosméticas.

40 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados en la descripción tienen el mismo significado que el corrientemente comprendido por cualquier especialista en el campo al que pertenece esta invención. Del mismo modo, todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y todas las demás referencias mencionadas en este documento se incorporan por referencia.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, se entiende que los ejemplos y las figuras se presentan solo a título ilustrativo y no limitan en ningún caso el alcance de la invención.

Leyenda de las figuras

45 Figura 1: Concentraciones finales al final de los ensayos de fermentación realizados en medios de fermentación licuados según el ejemplo 1. (A) Concentración de etanol y (B) concentración de glicerol. Los medios A, B y C se describen en la tabla 1.

Figura 2: Cinética de la producción de etanol por la cepa I-4072 (A) y los híbridos I-4790 (B) I-4791 (C) e I-4792 (D) en diferentes condiciones de fermentación.

50 Ejemplo 1: Selección de cepas originales para cruzar con la cepa I-4072

Un grupo de 21 cepas o clones se ha probado en fermentación alcohólica. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) con un exceso de azúcares en comparación con las capacidades de conversión en etanol de las cepas. En un primer caso, se utilizaron medios sintéticos que contienen

5 dextrinas de almidón con ayuda o no de sustancias solubles de los residuos de destilación. En un segundo caso, se utilizaron medios de fermentación preparados a partir de harina de maíz, fracciones solubles, residuos de destilación y agua de proceso en las proporciones dadas en la tabla siguiente. Estos diferentes elementos se obtuvieron de una planta de producción de etanol industrial según un proceso de primera generación. La mezcla a base de harina de maíz se licuó con ayuda de Liquozyme™ SCDS (Novozymes) a 85°C durante 3 horas después de ajustar el pH a 5,6. La dosis de empleo de Liquozyme™ fue de 0,8 ml/kg de harina utilizada. Antes de la siembra, el pH inicial se ajustó a 5,0 o 4,5; se añadieron diferentes concentraciones de urea (300, 600 y 1000 ppm de equivalentes de nitrógeno) como se indica en la tabla siguiente. Spyrizyme Fuel Ultra™ (Novozymes) se añadió a una dosis de 0,6 ml/kg de harina. La temperatura de fermentación se controló a 32°C. Las cepas se propagaron previamente en un medio sintético rico en matraces deflectores de 500 ml (propagación micro-aireada).

Tabla 1.

Medio	A	B	C
pH inicial	pH 4,5	pH 5,0	pH 4,5
Temperatura (°C)	32	32	32
Harina (g)	362,5	362,5	362,5
Materias solubles de residuos de destilación (g)	300	250	300
Urea (ppm)	300	600	1.000
Agua de proceso	c.s.p. 1 kg	c.s.p. 1 kg	c.s.p. 1 kg

15 Entre las diversas cepas ensayadas, la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072 se ha seleccionado como la cepa que produce más etanol de las cepas ensayadas. Entre las diferentes cepas ensayadas, la cepa I-4782 se seleccionó como una cepa que produce grandes cantidades de etanol y aunque inferiores a I-4072 y la que produce menos grandes cantidades de glicerol que la cepa I-4072.

Es interesante observar que la cinética de la producción de etanol del clon I-4782 es bastante lenta en comparación con la de la cepa I-4072. Las concentraciones finales de etanol y glicerol obtenidas durante los ensayos se muestran en las figuras 1A y 1B.

20 Por lo tanto, el objetivo era obtener, por hibridación, al menos un híbrido que tuviera una tolerancia al etanol mayor que la de la cepa I-4072, una producción de glicerol menor que la de la cepa I-4072 y una cinética producción de etanol al menos similar a la de la cepa I-4072.

Ejemplo 2: Obtención de nuevos híbridos

25 Una vez seleccionadas las cepas originales, se han efectuado diferentes etapas técnicas que conducen a la creación de nuevas cepas por cruzamiento, que comprenden:

- la obtención por esporulación y luego germinación de los secretores de las dos cepas progenitoras y la caracterización de su tipo sexual,
- la realización de cruces después del establecimiento de tablas de cruce, y
- el aislamiento e identificación de nuevos híbridos.

30 *Selección de secretores élites de la cepa I-4072.* Los secretores de la cepa I-4072 se generaron y evaluaron sobre la base de su producción de etanol. Luego, sobre la base de estos resultados, se seleccionaron 8 esporas de tipo sexual "alfa" y 12 esporas de tipo sexual "a" que poseen los mejores rendimientos en alcohol.

Realización de cruces y obtención de nuevas cepas. Con el fin de obtener nuevas cepas, se realizaron varias series de cruces entre los secretores de I-4072 seleccionados y los secretores de I-4782 seleccionados.

35 *Identificación de nuevos híbridos.* Los nuevos híbridos se han identificado por tipo de apareamiento de PCR.

Numerosas cepas se han creado y validado al final de los cruces realizados. Entre los híbridos I-4791, I-4790 y I-4792, objetos de la presente solicitud se distinguen particularmente, como se indica más adelante.

Ejemplo 3: Selección de nuevos híbridos

A fin de poder seleccionar los mejores híbridos entre las 292 cepas recién creadas, se han desarrollado 4 niveles de selección. Estas selecciones se basan en seguimientos de pérdida de masa de medios de fermentación de alcohol después de la siembra con las cepas a estudiar contra el testigo I-4072 y la medición de la concentración de etanol, glucosa restante y glicerol producto después de 72 horas de fermentación a diferentes temperaturas (35°C y 38°C). Los medios de fermentación utilizados han sido medios sintéticos que contenían una alta concentración de glucosa, superior a las capacidades de conversión en etanol de las cepas ensayadas. Los criterios de selección son una mejor cinética de pérdida de masa que la cepa I-4072 y/o una producción disminuida de glicerol en comparación con la cepa I-4072. La pérdida de masa es un indicador indirecto de la producción de etanol para las levaduras según la ecuación estequiométrica: $1 \text{ mol glucosa} \rightarrow 2 \text{ mol CO}_2 + 2 \text{ mol etanol}$ que permite vincular globalmente la masa de pérdida de masa del medio en forma de CO₂ producido y evaporado a la masa de etanol producido.

Al final, en 292 cepas, se seleccionaron 18 híbridos, incluidas las cepas I-4790, I-4791 e I-4792. Estos últimos se han elegido porque presentan las siguientes características:

- híbrido I-4790: a las temperaturas de 35°C y 38°C, para una producción de etanol equivalente a la de la cepa I-4072, la producción de glicerol ha disminuido en un 15 a 20%. Sin embargo, la cinética de pérdida de masa es menor que la de la cepa I-4072.
- híbrido I-4791: a las temperaturas de 35°C y 38°C, la producción de etanol se incrementa en un 3,5% con respecto a la de la cepa I-4072, la cinética de pérdida de masa es más rápida que el de la cepa I-4072, y la producción de glicerol es equivalente a la de la cepa I-4072.
- híbrido I-4792: a las temperaturas de 35°C y 38°C, la producción de etanol es equivalente a la de I-4072 (con una ligera mejora a 38°C), la cinética de la pérdida de masa es equivalente a la de I-4072, y la producción de glicerol es inferior a 7,5 a 8% con respecto a la de I-4072.

Ejemplo 4: Producción de etanol a partir de harina de maíz por híbridos en exceso de azúcares en el medio

Se llevaron a cabo pruebas en medios a base de harina de maíz y de fracción de materias solubles de residuos de destilación industriales. Los ensayos se llevaron a cabo a diferentes temperaturas de fermentación, con diferentes adiciones de nitrógeno y a diferentes pH iniciales. Las características que se han estudiado son: la tolerancia máxima al etanol de las cepas, la producción de glicerol y la cinética de la producción de etanol.

Las pérdidas de masa de los medios de fermentación se han medido a lo largo del tiempo. En la estabilización de la pérdida de masa, se ha realizado un muestreo del medio de fermentación y se ha realizado un ensayo por HPLC de las concentraciones de etanol y glicerol. Las masas de etanol y glicerol producidas se han calculado a partir de la concentración medida y la masa de mosto de fermentación en el momento del muestreo para realizar el ensayo y los valores de concentración y de masas iniciales.

Protocolo. Los medios de fermentación se han preparado a partir de harina de maíz, de fracciones de materias solubles de los residuos de destilación y del agua de proceso. Para simular mejor las condiciones de producción industrial, estos diferentes elementos se han obtenido a partir de las plantas de producción de etanol industrial según procesos de primera generación. Las proporciones de los tres componentes industriales fueron: harina de maíz (36% p/p), fracción de materias solubles de los residuos de destilación (35% p/p) y agua de proceso (29% p/p). La mezcla se ha licuado con ayuda de Liquozyme™ SCDS (Novozymes) a 85°C durante 3 horas después de ajustar el pH a 5,6. La dosis de empleo de Liquozyme™ ha sido de 0,8 ml/kg de harina utilizada. Antes de la siembra, el pH se ha ajustado a 5 o 4 (según la tabla), se agregaron diferentes concentraciones de urea (150, 250 y 500 ppm de nitrógeno equivalente). Se ha añadido Spyrizyme Fuel Ultra™ (Novozymes) a una dosis de 0,6 ml/kg de harina. Las cepas se han propagado previamente en un medio sintético rico en matraces deflectores de 500 ml (propagación micro-aireada). Se ha preparado una crema de levadura a partir del medio de propagación por centrifugación y se resuspensión en el agua del sedimento de centrifugación. Se ha realizado una materia seca sobre la crema de levadura y el medio de fermentación se ha sembrado con la crema para tener una velocidad de siembra de 0,5 g de equivalente de levadura seca/kg de medio.

Pruebas realizadas. La siguiente tabla presenta las condiciones de los ensayos de fermentación efectuados y las cepas utilizadas.

Tabla 2. Condiciones de los ensayos de fermentación.

Ensayos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Condiciones															
Medio	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B
T (°C)	32	35	38	35	35	35	35	35	35	32	32	35	35	38	38
N (ppm)	500	500	500	150	250	500	150	250	500	500	500	500	500	500	500
pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	4
Cepas probadas															
I-4072	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
I-4790	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
I-4791	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
I-4792						x			x	x	x	x	x	x	x

A: 36% de harina de maíz, 35% de materias solubles de residuos de destilación, 29% de agua de proceso

5 B: 36% de harina de maíz, 35% de materias solubles de residuos de destilación, 29% de agua de proceso

N: aporte de nitrógeno

Resultados. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas a continuación.

Tablas 3 a 4. Concentraciones finales de etanol y glicerol y masas de etanol y glicerol producidas en los ensayos 1-9.

ES 2 648 269 T3

Tabla 3.

Cepa	Concentraciones finales (g/kg)			Masa producida (g/kg de medio utilizado)	
	Equiv. glucosa	glicerol	Etanol	glicerol	Etanol
Ensayo: 1 32°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	40,9	7,9	121,3	5,3	107,6
I-4790	35,4	7,5	123,9	4,8	109,3
I-4791	37,1	8,4	129,6	5,7	114,8
Ensayo: 2 35°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	37,7	6,7	110,5	5,0	98,9
I-4790	28,7	6,2	116,4	4,5	103,8
I-4791	32,7	6,5	111,5	4,8	99,7
Ensayo: 3 38°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	75,6	6,4	90,3	4,8	82,3
I-4790	74,0	5,5	93,5	4,0	85,2
I-4791	72,1	6,3	93,4	4,6	85,0
Ensayo: 4 150 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	46,2	15,9	109,9	8,5	98,6
I-4790	26,6	14,8	116,1	7,4	103,4
I-4791	34,4	15,5	113,5	8,1	101,3
Ensayo: 5 250 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	27,9	15,9	108,2	8,5	96,4
I-4790	20,5	15,3	117,7	7,9	104,4
I-4791	26,6	15,3	112,3	8,0	99,8
Ensayo: 6 500 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	15,9	15,7	117,4	8,3	104,2
I-4790	11,4	14,8	122,0	7,4	108,0
I-4791	16,0	15,0	119,9	7,7	106,4
I-4792	11,2	15,4	122,4	8,0	108,4

ES 2 648 269 T3

Cepa	Concentraciones finales (g/kg)			Masa producida (g/kg de medio utilizado)	
	Equiv. glucosa	glicerol	Etanol	glicerol	Etanol
Ensayo: 7 150 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	27,8	15,9	103,9	9,0	93,4
I-4790	17,1	15,2	111,1	7,9	99,5
I-4791	23,1	15,9	108,2	8,6	97,1
Ensayo: 8 250 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	35,2	16,3	114,9	9,0	102,6
I-4790	22,6	15,5	122,1	8,1	108,4
I-4791	30,6	15,2	117,5	7,9	104,6
Ensayo: 9 500 ppm N, 35°C, pH 5					
I-4072	28,4	15,8	132,2	8,2	109,2
I-4790	18,6	15,3	128,1	7,7	113,3
I-4791	22,5	14,8	122,5	7,4	108,6
I-4792	17,3	15,1	125,5	7,6	111,0

Tabla 4

Cepa	Concentraciones finales (g/kg)			Masa producida (g/kg de medio utilizado)	
	Equiv. glucosa	glicerol	Etanol	glicerol	Etanol
Ensayo: 11 32°C, 500 ppm N, pH 4					
I-4072	35,4	15,0	117,1	13,4	104,2
I-4790	27,0	14,4	122,9	12,8	109,0
I-4791	35,5	14,6	117,7	13,0	104,9
I-4792	26,9	14,4	122,9	12,7	108,9
Ensayo: 10 32°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	18,5	16,2	127,3	14,3	112,2
I-4790	16,2	15,1	129,5	13,3	114,1
I-4791	22,5	15,5	126,2	13,7	111,3
I-4792	15,3	15,3	130,3	13,4	114,6
Ensayo: 13 35°C, 500 ppm N, pH 4					
I-4072	46,4	15,1	105,5	13,6	94,7
I-4790	33,8	14,5	117,6	12,9	104,7
I-4791	46,0	14,8	110,6	13,1	98,5
I-4792	37,3	14,9	114,8	13,3	102,4
Ensayo: 12 35°C, 500 ppm N, pH 5					
I-4072	31,6	16,5	117,4	14,7	104,4
I-4790	30,5	15,4	119,9	13,7	106,6
I-4791	31,7	15,7	117,7	14,0	104,7
I-4792	27,2	15,9	121,2	14,1	107,6
Ensayo: 15 38°C, 500 ppm N, pH 4					
I-4072	82,7	14,1	87,7	12,9	80,2
I-4790	80,3	13,1	85,8	11,9	78,4
I-4791	80,9	12,9	88,1	11,8	80,5
I-4792	82,7	13,5	86,4	12,3	78,9

Ensayo: 14		38°C, 500 ppm N, pH 5			
I-4072	72,7	14,8	93,4	13,5	84,8
I-4790	76,0	13,8	92,2	12,5	83,9
I-4791	76,8	14,3	92,1	13,0	83,8
I-4792	75,8	14,070	93,375	12,8	84,9

5 Estos resultados demuestran claramente que los híbridos tienen mayor tolerancia al etanol que la cepa de partida I-4072 (que presenta una ventaja de 2 a 3% sobre la cepa I-4072) y que producen menos glicerol que la cepa I-4072. Esta menor producción de glicerol por las cepas I-4790, I-4791 y I-4792 debería conducir lógicamente a un mejor rendimiento de conversión de azúcares consumidos en etanol.

Cinética de producción de etanol. A modo de ejemplo, las cinéticas de pérdida de masa de los ensayos 10-13 se presentan en la figura 2.

10 Estos resultados demuestran que la cepa I-4072 posee la cinética de producción de etanol más rápida de todas las cepas probadas. Entre los híbridos de la invención, el híbrido I-4791 tiene una cinética de producción de etanol que es sustancialmente similar a la de la cepa I-4072. Por el contrario, el híbrido I-4790 presenta la cinética más lenta con retrasos de hasta 10 horas a pH 5.

Ejemplo 5. Ensayos de producción de etanol a partir de harina de maíz por híbridos en concentraciones limitativas en azúcares en el medio

15 *Rendimiento de conversión en etanol.* Con el fin de confirmar los resultados anteriores, se realizaron varios ensayos con concentraciones en harina de maíz inferiores a las utilizadas en los ensayos del ejemplo 4 y de manera que las cepas podrían consumir totalmente los azúcares fermentables del medio. Los ensayos realizados se proporcionan en la tabla 5 a continuación:

Tabla 5. Condiciones de fermentación

Ensayos	16	17	18	19
Condiciones				
Medio	C	D	C	D
T (°C)	32	35	32	35
N (ppm)	250	250	150	150
pH	5	5	5	5
Cepas probadas				
I-4072	x	x	x	x
I-4790	x	x	x	x
I-4791	x	x	x	x
I-4792	x	x	x	x

20 C: 32°C: 33% de harina de maíz, 35% de materias solubles de los residuos de destilación, 32% de agua de proceso.

ES 2 648 269 T3

D: 35°C: 30% de harina de maíz, 35% de materias solubles de los residuos de destilación, 35% de agua de proceso.

Los resultados se muestran en las tablas 6 y 7 siguientes.

Tabla 6.

Cepa	Concentraciones finales (g/kg)			Masa producida (g/kg de medio utilizado)	
	Equiv. glucosa	glicerol	Etanol	glicerol	Etanol
Ensayo: 16 32°C, 150 ppm N, pH 5					
I-4072	1,6	16,9	118,7	8,3	105,3
I-4790	1,6	15,9	122,3	7,4	108,6
I-4791	1,8	17,1	121,9	8,5	108,2
I-4792	1,9	16,5	119,8	7,9	106,4
Ensayo: 17 35°C, 150 ppm N, pH 5					
I-4072	1,5	16,1	102,4	7,7	91,7
I-4790	1,4	14,7	107,9	6,5	96,6
I-4791	1,5	15,1	108,1	6,8	96,6
I-4792	1,4	15,0	109,6	6,7	97,9

5

Tabla 7.

Cepa	Concentraciones finales (g/kg)			Masa producida (g/kg de medio utilizado)	
	Equiv. glucosa	glicerol	Etanol	glicerol	Etanol
Ensayo: 18 32°C, 250 ppm N, pH 5					
I-4072	1,9	14,8	116,2	8,1	103,6
I-4790	1,5	13,9	117,1	7,2	104,4
I-4791	1,7	13,9	117,3	7,3	104,7
I-4792	1,6	14,6	116,7	7,8	104,2
Ensayo: 19 35°C, 250 ppm N, pH 5					
I-4072	1,5	14,5	106,1	7,9	95,3
I-4790	1,4	13,0	106,5	6,5	95,9
I-4791	1,5	13,6	105,8	7,1	95,2
I-4792	1,5	13,9	103,2	7,3	92,9

Los resultados obtenidos confirman las observaciones hechas en las pruebas anteriores: los híbridos I-4790, I-4791 e I-4792 producen significativamente menos glicerol y más etanol que la cepa de referencia I-4072 en particular a la dosis de nitrógeno (N) aportado reducido.

10

Conclusiones. Los resultados obtenidos demuestran claramente que:

- el híbrido I-4791 presenta: una cinética de producción de etanol idéntica o similar a la de I-4072, una tolerancia mejor al etanol (+2%), una producción menor de glicerol (-5%), y un rendimiento mejor en etanol (+2%);

- el híbridos I-4790 presenta: una mejor tolerancia al etanol que I-4072 (+3%), menor producción de glicerol (-10%) y mejor rendimiento en etanol (+2%), pero una cinética producción de etanol más lenta que la de I-4072.

- 5 - el híbrido I-4792 presenta: una mejor tolerancia al etanol que I-4072 (+3%), excepto en condiciones adversas (38°C/pH 4), una cinética de producción de etanol similar a la de I-4072, menor producción de glicerol (-5%) y mayor rendimiento en etanol (+1%).

Ejemplo 6: Ensayos de producción de levaduras a partir de 3 híbridos seleccionados

- 10 Los híbridos seleccionados se han multiplicado, a escala piloto, en condiciones aireadas según un esquema fed-batch bien conocido por los expertos en la técnica. Las levaduras obtenidas se han secado según las técnicas habituales. Estos ensayos de producción de levaduras se han desarrollado sin que se haya constatado ningún problema particular.

Los ensayos de producción de etanol se han realizado a partir de levaduras secas instantáneas producidas con objeto de verificar que el proceso de producción de levadura no altera los rendimientos de las cepas producidas.

- 15 *Protocolo.* Los medios de fermentación se han preparado a partir de harina de maíz, fracciones de materias solubles de los residuos de destilación y agua de proceso. Estos diferentes elementos se obtuvieron de plantas de producción de etanol industrial. Las proporciones de los tres componentes industriales fueron: harina de maíz (36% p/p), fracción de materias solubles de destilación (35% p/p) y agua (29% p/p). La mezcla se ha licuado con ayuda de Liquozyme SCDS™ (Novozymes) a 85°C durante 3 horas después de ajustar el pH a 5,6. La dosis de empleo de Liquozyme™ ha sido de 0,8 ml/kg de harina utilizada.
- 20

- Las levaduras secas producidas a partir de híbridos de I-4790, I-4791 e I-4792 y de la levadura comercial Ethanol Red™ se han propagado en medio líquido diluido en agua (70% m/m, 30% m/m). La tasa de siembra fue de 0,5 g de levadura seca/kg de medio, el pH se ha ajustado a 5, la temperatura de propagación ha sido de 32°C, se ha añadieron urea (500 ppm) y Spirizyme Fuel Ultra™ (0,6 ml/kg de harina). El medio de propagación se ha transferido al medio de fermentación con una transferencia de 10% masa/masa.
- 25

Las fermentaciones se han realizado en las condiciones descritas en la tabla 8.

Tabla 8.

Ensayos		20	21	22	23
Condiciones					
Medio		B	B	B	B
T (°C)		32	35	32	35
urea (ppm)		500	500	300	300
pH inicial		5	5	5	5
Levaduras secas instantáneas probadas					
levadura Ethanol Red™					
I-4790	Lote 1	x	x	x	x
I-4790	Lote 2	x	x	x	X
I-4791	Lote 1	x	x	x	X
I-4791	Lote 2	X	x	x	x
I-4792	Lote 1	X	x	x	x
I-4792	Lote 2	x	x	x	X

ES 2 648 269 T3

B: 36% de harina de maíz, 35% de materias solubles procedentes de residuos de destilación, 29% de agua de proceso

5 Los resultados obtenidos, que se proporcionan en la tabla 9, confirman, dentro de los límites de la precisión de los ensayos realizados, los resultados ya obtenidos y confirman la posibilidad de producir y secar las cepas I-4790, I-4791 e I-4792.

Conclusiones. Los resultados obtenidos según la invención han permitido obtener levaduras industriales con rendimientos significativamente mejorados desde el punto de vista de la productividad y del rendimiento cuando se utilizan para la producción de etanol a partir de azúcares procedentes de biomásas vegetales.

Con respecto al producto de referencia del mercado (Ethanol Red™):

- 10 - La cepa industrial I-4790 hace posible mejorar la productividad en etanol en +2% con un rendimiento de etanol/azúcar mejorado gracias a la reducción del 10% de la cantidad de glicerol generada;
- La cepa industrial I-4791 permite mejorar la productividad en etanol en +2% con un rendimiento de etanol/azúcar mejorado gracias a la reducción del 5% de la cantidad de glicerol generada;
- 15 - La cepa industrial I-4792 permite mejorar la productividad en etanol en +1% con un rendimiento de etanol/azúcar mejorado gracias a la reducción del 5% de la cantidad de glicerol generada.

Tabla 9.

Cepa	lote	Concentraciones finales (g/kg)			Masas producidas (g/kg de medio utilizado)	
		glucosa	glicerol	etanol	glicerol	etanol
32°C, 300 ppm						
Levadura seca instantánea						
Ethanol Red™		18,3	16,9	113,5	8,3	95,6
I-4791	1	10,6	16,8	118,1	8,1	99,2
I-4791	2	10,7	16,8	119,5	8,1	100,5
I-4790	1	12,1	15,8	116,8	7,3	98,4
I-4790	2	16,5	16,1	109,5	7,7	92,2
I-4792	1	16,2	16,4	112,9	7,8	95,2
I-4792	2	14,4	16,4	112,8	7,8	94,8
35°C, 300 ppm urea						
Ethanol Red™		33,6	16,1	103,1	7,7	86,9
I-4791	1	29,7	15,9	103,5	7,4	87,0
I-4791	2	33,3	15,9	101,9	7,5	85,9
I-4790	1	29,3	15,5	103,4	7,1	87,2
I-4790	2	27,9	15,5	107,8	7,1	90,9
I-4792	1	33,2	15,4	102,9	7,0	86,9
I-4792	2	38,0	15,2	99,8	6,9	84,3

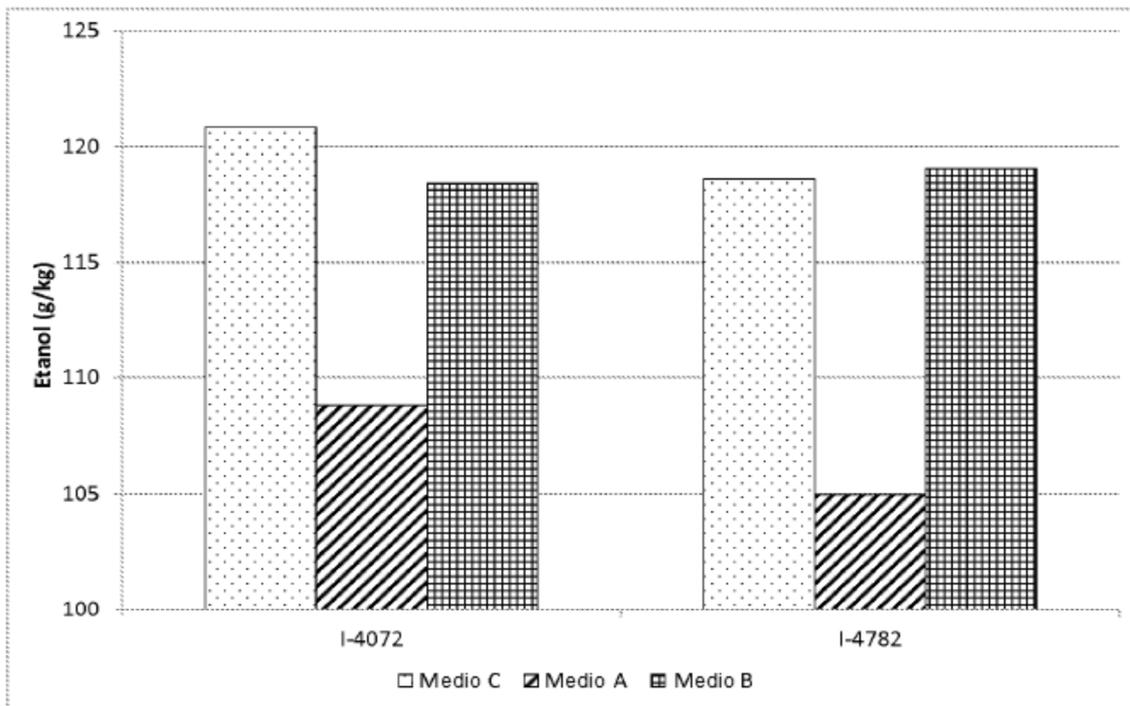
ES 2 648 269 T3

Cepa		Concentraciones finales (g/kg)			Masas producidas (g/kg de medio utilizado)	
Levadura seca instantánea	lote	glucosa	glicerol	etanol	glicerol	etanol
32°C, 500 ppm urea						
Ethanol Red™		11,8	17,0	116,4	8,2	97,4
I-4791	1	3,4	15,8	121,2	7,0	100,7
I-4791	2	6,3	16,5	119,5	7,7	100,0
I-4790	1	4,6	16,0	112,0	7,4	93,4
I-4790	2	5,1	16,0	124,0	7,4	104,1
I-4792	1	5,9	16,5	121,3	7,8	101,9
I-4792	2	6,7	16,5	121,9	7,8	102,3
35°C, 500 ppm urea						
Ethanol Red™		21,3	16,0	116,5	7,5	98,1
I-4791	1	19,8	15,8	118,5	7,2	99,6
I-4791	2	19,1	15,9	119,9	7,3	101,0
I-4790	1	19,1	15,2	116,3	6,8	97,8
I-4790	2	19,4	15,0	115,7	6,6	97,3
I-4792	1	20,3	15,6	118,7	7,1	100,2
I-4792	2	20,3	15,8	118,2	7,3	99,5

REIVINDICACIONES

1. Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada entre la cepa de levadura presentada el 25 de julio de 2013 en la CNCM con el número I-4791, la cepa de levadura depositada 25 de julio de 2013 a la CNCM con el número I-4790, y la cepa de levadura depositada el 25 de julio de 2013 con el número I-4792.
- 5 2. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenida cultivando una cepa de levadura según la reivindicación 1.
3. Utilización de una cepa de levadura según la reivindicación 1 o una levadura según la reivindicación 2 en la producción de etanol de primera generación a partir de biomasa.
4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada por que la biomasa es rica en azúcar, en almidón o en una de sus mezclas.
- 10 5. Utilización según la reivindicación 4, caracterizada por que la biomasa comprende o procede de caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo azucarero, maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, triticale, patata, boniato, yuca o una de sus mezclas.
6. Procedimiento de producción de etanol de primera generación a partir de biomasa que comprende una etapa de fermentación utilizando una cepa de levadura según la reivindicación 1 o una levadura según la reivindicación 2.
- 15 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la biomasa es rica en azúcar, en almidón o en una de sus mezclas.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la biomasa comprende caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo azucarero, maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, triticale, patata, boniato, yuca o una de sus mezclas.
- 20

A



B

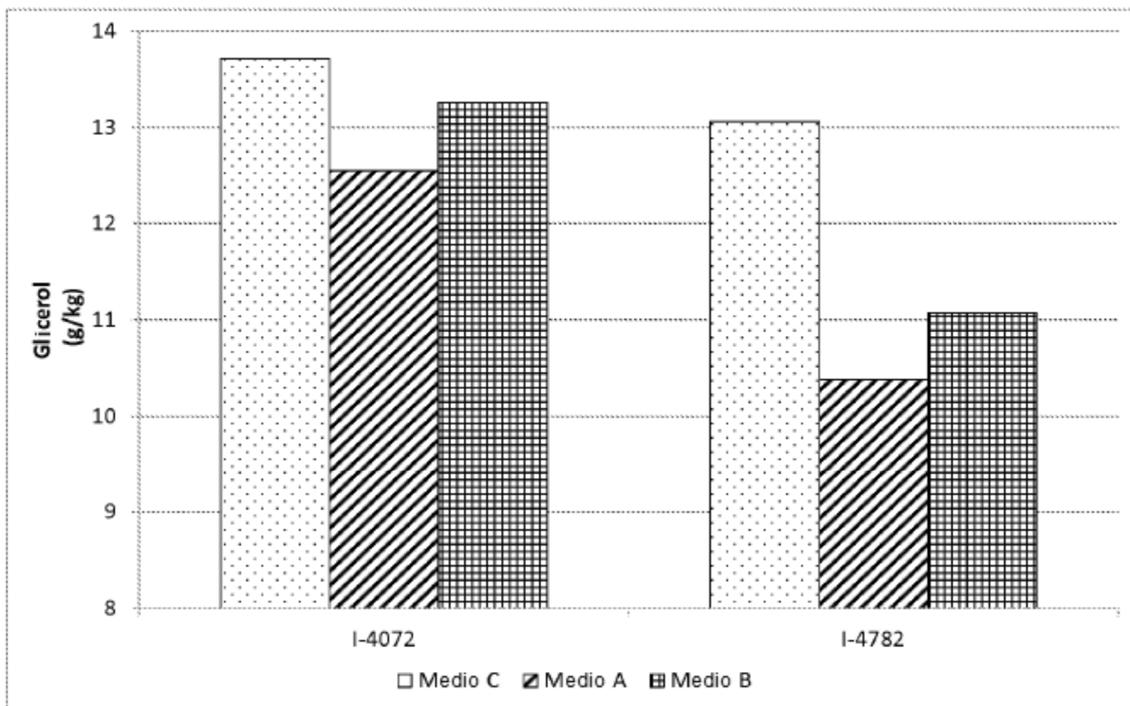
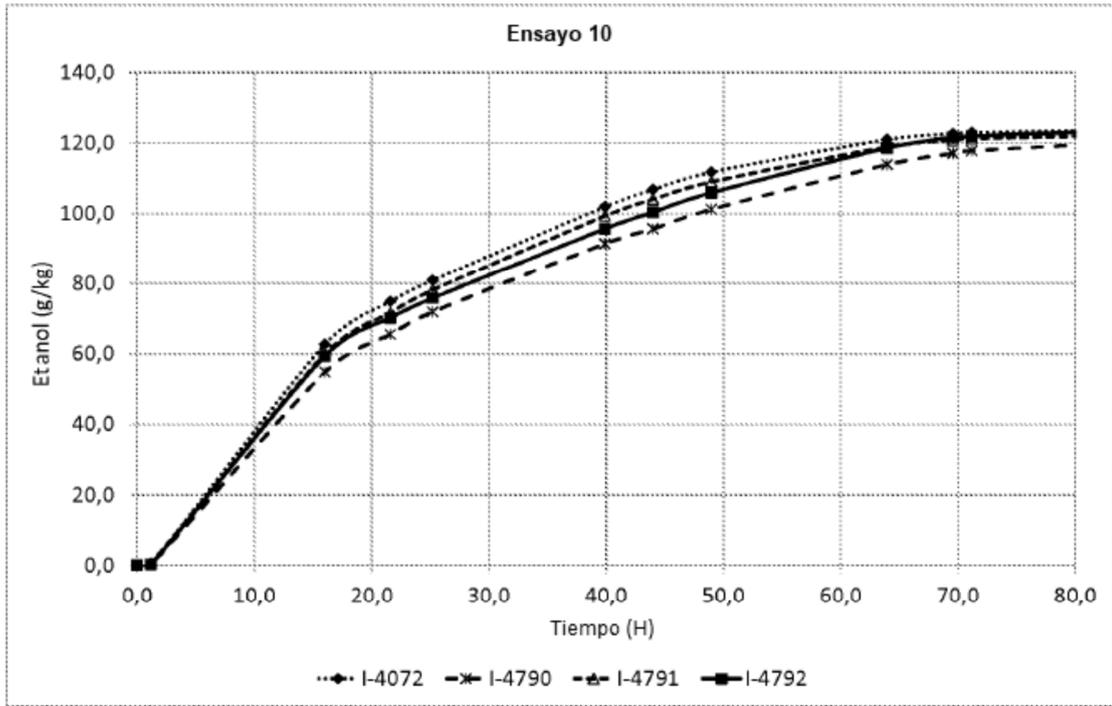


Figura 1(A)-(B)

A



B

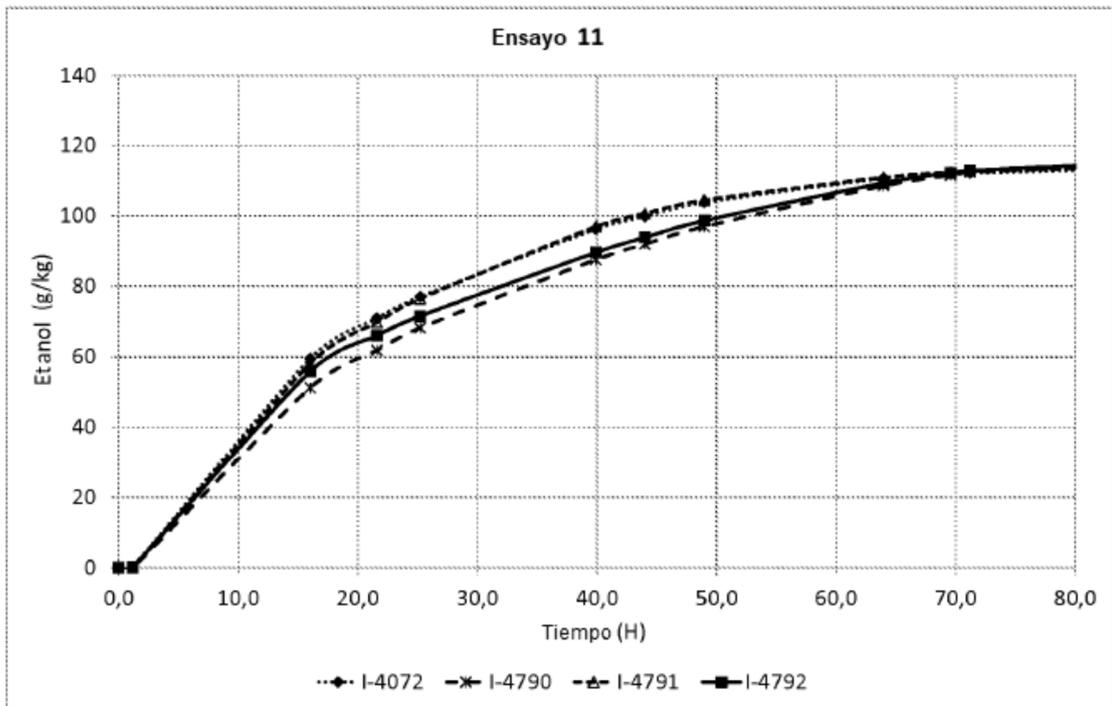
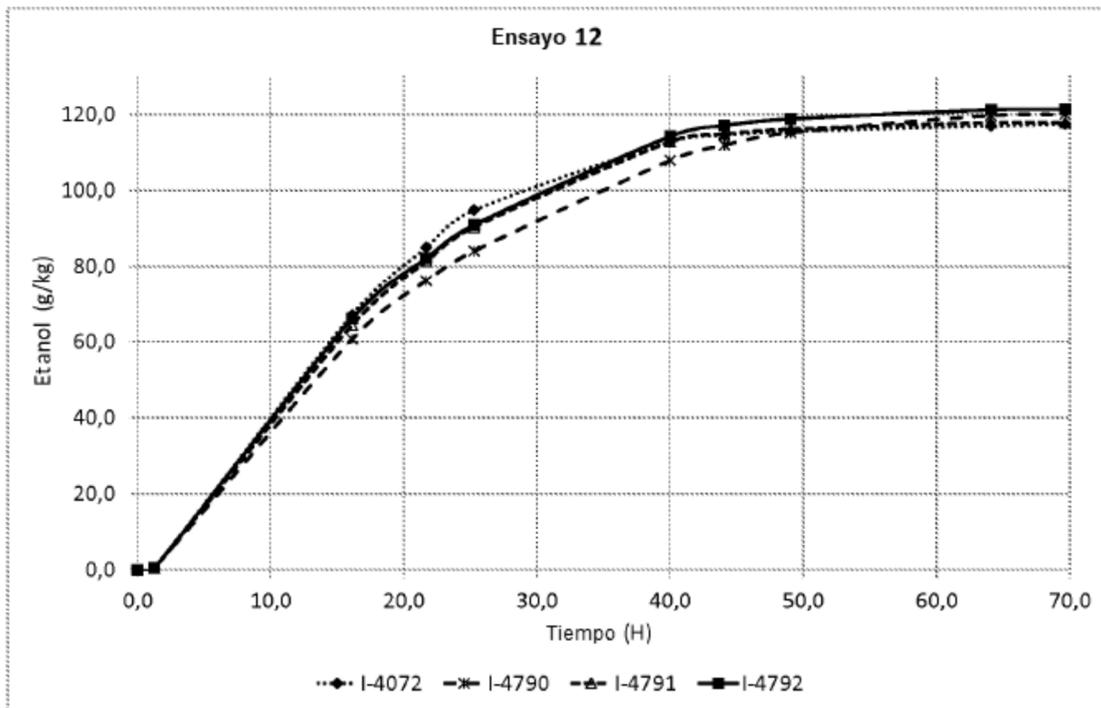


Figura 2(A)-(B)

C



D

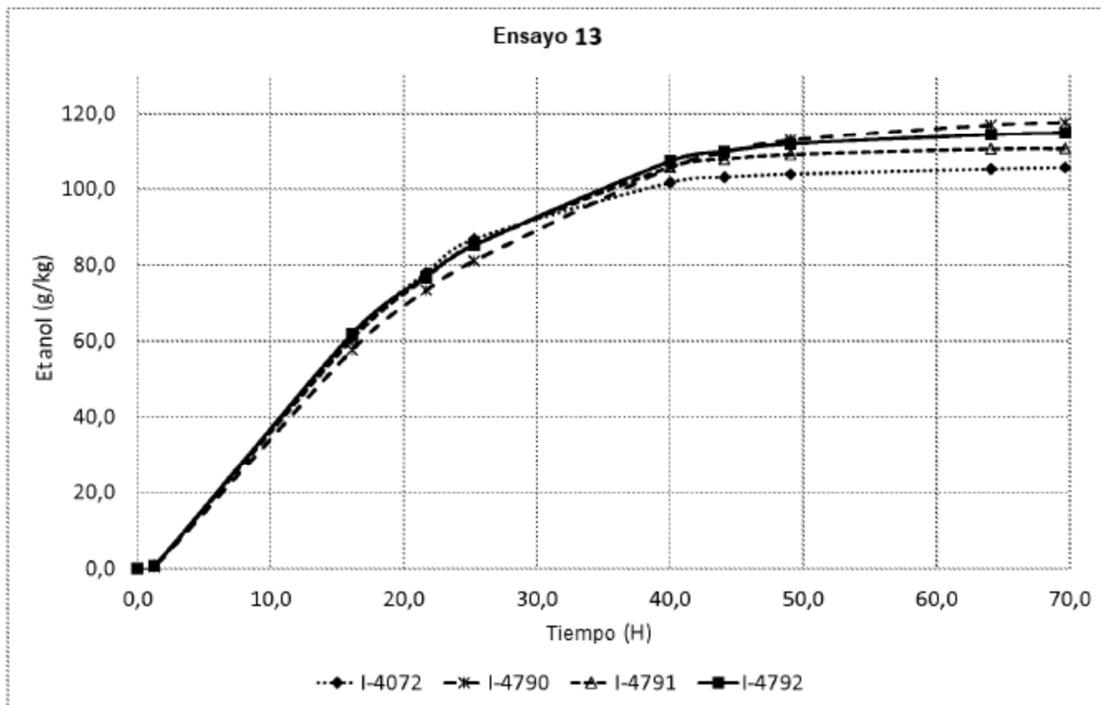


Figura 2(C)-(D)