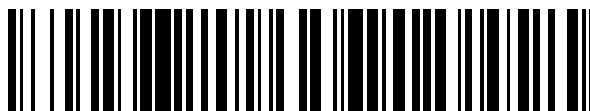


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 521**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2011** **PCT/FR2011/050750**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011** **WO11128552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2011** **E 11719330 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2558583**

54 Título: **Levadura industrial, capaz de producir etanol a partir de al menos una pentosa**

30 Prioridad:

30.04.2010 FR 1001853

14.04.2010 FR 1001583

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2018

73 Titular/es:

LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)

41, rue Etienne Marcel

75001 Paris, FR

72 Inventor/es:

DESFOUGERES, THOMAS;

PIGNEDE, GEORGES;

RAVE, CHRISTOPHE;

BAVOUZET, JEAN-MICHEL y

COLAVIZZA, DIDIER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 521 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

Levadura industrial, capaz de producir etanol a partir de al menos una pentosa

El presente documento se refiere al campo de los procedimientos de obtención de cepas de levadura productoras de etanol, de las levaduras obtenidas de este modo, y de la producción industrial de etanol a partir de dichas levaduras. Más específicamente, se refiere, en su aspecto más general, a un procedimiento de preparación de levaduras a partir de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* llamadas industriales, dichas levaduras y su aplicación a la producción industrial de etanol a partir de medios industriales que comprenden al menos una pentosa.

El punto común de los enfoques de la técnica anterior del campo consiste en procedimientos que pretenden la mejora de cepas llamadas de laboratorio con patrimonio genético conocido y/o construido y cuyas aptitudes para producir etanol se estudian en general en medios y en condiciones de laboratorio estandarizadas y óptimas.

En efecto, la bibliografía científica, así como los documentos de patente analizados por la solicitante enseñan, generalmente, procedimientos de obtención de cepas haploides o diploides, poco tolerantes al estrés particularmente a las fuertes concentraciones de etanol y/o a las temperaturas elevadas y/o a inhibidores de la fermentación. Además, estos procedimientos necesitan en su mayor parte recurrir, para estas cepas, a la utilización de marcadores de auxotrofia y/o de marcadores de resistencia a antibióticos que pueden descalificarlos para una utilización posterior en medio industrial por razones evidentes de coste incluso algunas veces de salud pública.

Bengtsson y col. (Biotechnology for Biofuels, 2009, 2:9) describe cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* de laboratorio que presentan varias modificaciones: sobreexpresión de los genes de xilosa reductasa (XR) mutados, K270M o K270R, y de xilitol deshidrogenasa (XDH) de *Pichia stipitis*, sobreexpresión de la xilulocinasa endógena y de la vía no oxidativa de las pentosas fosfato, y eliminación de la actividad aldosa reductasa por delección del gen GRE3.

Las propiedades de crecimiento de las cepas desarrolladas anteriormente son, en general, insuficientes y estas cepas no se han confrontado nunca a los imperativos de producción de biomasa a escala industrial, a saber por no citar más que tres: fuerte tasa de crecimiento, aptitud para el secado, estabilidad en conservación.

Si se obtienen niveles de rendimiento llamados fermentativos (aptitud para la producción anaerobia de etanol) en medios sintéticos o definidos, llamados de laboratorio, con estas cepas anteriores, estos no son transponibles en general, en medios industriales que constan de las mezclas complejas obtenidas por ejemplo de residuos de tratamiento de materiales celulósicos o lignocelulósicos que contienen compuestos tóxicos que pueden inhibir a diferentes niveles la maquinaria celular de la levadura, particularmente furfural, HMF, derivados fenólicos, ácido acético. Además, la aptitud para el "scale up" o transposición de escala de estos procedimientos anteriores de producción de etanol está documentada raramente.

La solicitante ha constatado de este modo que existe todavía la necesidad de un procedimiento de preparación de una levadura llamada industrial que tiene en cuenta a la vez las limitaciones del productor de levadura y al mismo tiempo las de un usuario final en sus aplicaciones particularmente en términos de producción industrial de etanol con bajo coste y alto rendimiento.

Es justamente satisfacer esta doble necesidad lo que pretende la presente invención.

Se describe en el presente documento un procedimiento de preparación de una cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* capaz de producir etanol a partir de un medio que consta al menos de una pentosa y que comprende las etapas siguientes que consisten en:

- (i) Seleccionar y proporcionar una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* llamada industrial capaz de producir fuertes concentraciones de etanol, de al menos el 14,5 % (v/v) y preferiblemente al menos el 16 % en un hidrolizado de cereales, en condiciones de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) y a una temperatura de 35 °C,
- (ii) Integrar al menos una casete de expresión o de delección en el genoma de la levadura de la etapa (i), seleccionándose dicha al menos una casete entre el grupo constituido por:
 - a. La asociación de tipo marco abierto de lectura (ORF) del gen de *Pichia stipitis* XRm que codifica la enzima xilosa reductasa mutada utilizando NADH;H⁺ como cofactor preferente en lugar de NADPFI;H⁺ / promotor y terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, estando dicha casete flanqueada cadena arriba y cadena abajo por regiones recombinógenas que permiten su integración dirigida en el genoma,
 - b. La asociación de tipo marco abierto de lectura (ORF) del gen de *Pichia stipitis* XDH que codifica la enzima xilitol deshidrogenasa / promotor y terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, estando dicha casete flanqueada cadena arriba y cadena abajo por regiones recombinógenas que permiten su integración dirigida en el genoma,

- c. La asociación de tipo marco abierto de lectura (ORF) del gen de *Saccharomyces cerevisiae* XKS1 que codifica la enzima xilulocinasa / promotor y terminador de *Saccharomyces cerevisiae*, estando dicha casete flanqueada cadena arriba y cadena abajo por regiones recombinógenas que permiten su integración dirigida en el genoma,

- 5 (iii) Inducir la expresión de al menos un gen de cada etapa de la parte no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato colocándolas bajo el control de un promotor de un gen de la glucólisis fuertemente expresado durante una fermentación alcohólica, y
- (iv) Delecionar al menos dos copias del marco abierto de lectura (ORF) del gen de *Saccharomyces cerevisiae* GRE3 que codifican una aldosa deshidrogenasa.

10 El procedimiento descrito en el presente documento presenta, en particular, las ventajas siguientes:

Para el fabricante de levadura, permite:

- la construcción de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* aneuploide/poliploide, protótrofa para permitir la producción de biomasa en fuentes simples de carbono, nitrógeno, fósforo en medios de bajo coste tales como los subproductos de la industria azucarera como la melaza por ejemplo,
- 15 - disponer de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que presenta una tasa de crecimiento máxima (μ_{max}) comprendida entre $0,37 \text{ h}^{-1}$ y $0,5 \text{ h}^{-1}$
- disponer de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que, cuando se produce según un procedimiento tal como se describe en el libro de referencia "Yeast Technology" (2ª edición, 1991, G. Reed y T.W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8), permite obtener un rendimiento de producción de biomasa de al menos 45 g de materia seca de levadura por 100 g de equivalente de sacarosa empleado,
- 20 - disponer de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* resistente al procedimiento de secado tal como se describe en los documentos de patente EP 511108 y US 5 741 695, no debiendo la pérdida de actividad fermentativa después del secado superar el 30 %.
- 25 - la producción en condiciones industriales (en particular medio de bajo coste, buen rendimiento de biomasa, levadura seca lista para usar) de una levadura fresca o seca a partir de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente estable, robusta ya que es particularmente tolerante a las concentraciones elevadas de etanol y capaz de producir, a partir por ejemplo de biomasa hemicelulósicas, etanol a al menos 80 g/l y esto a una temperatura elevada del orden de 30 a 40 °C.
- 30 Por otra parte, para el productor de etanol, la ventaja del procedimiento descrito en el presente documento es disponer de una levadura activa (fresca - líquida o comprimida - o seca), obtenida según un procedimiento de producción tal como se describe en la obra "Yeast Technology", a partir de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* tal como se define en el párrafo anterior que es:
- capaz, en las condiciones de SSF descritas en el documento de patente WO 2004/046333, de fermentar a 35 °C un hidrolizado de cereales hasta una concentración de etanol del 14,5 % (v/v) mínimo,
- 35 - capaz, en las condiciones de SSF descritas en el documento de patente WO 2004/046333, de fermentar a 35 °C un hidrolizado de cereales hasta una concentración de etanol del 16 % (v/v) mínimo.

Los resultados del procedimiento descrito en el presente documento son tanto más destacables en cuando que se han obtenido a partir de una cepa llamada industrial, aneuploide/poliploide protótrofa y, que tiene de hecho un material genético netamente más complejo que el de una cepa llamada de laboratorio, lo que hace cuando menos imprevisibles las consecuencias de modificaciones de dicha cepa industrial. Este fondo genético complejo, específico de las cepas industriales, hace tanto más difícil la obtención de cepas genéticamente modificadas libres al final de marcadores de resistencia a antibióticos, en particular cuando se deben modificar numerosas dianas genéticas. Las cepas libres de marcadores de resistencia a antibióticos son, claramente, preferibles por razones de salud y medioambientales.

La solicitante ha demostrado que las modificaciones genéticas según el procedimiento descrito en el presente documento, aplicadas a una cepa industrial con patrimonio genético complejo y que presentan una capacidad de producir fuertes concentraciones de etanol, no inducen ninguna inestabilidad genómica.

Las cepas protótrofas descritas en el presente documento presentan la ventaja de crecer en fuentes simples de carbono, de nitrógeno y de fósforo.

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

Es necesario, por lo tanto, disponer de herramientas/vectores que utilizan marcadores de resistencia a antibióticos, construyéndose estas llamadas herramientas/vectores construidos para permitir, al final, la escisión de estos marcadores. La construcción de levaduras según la invención necesitó por ejemplo el empleo de 4 marcadores positivos diferentes (geneticina, fleomicina, higromicina y blasticidina).

- 5 Las cepas descritas en el presente documento son aneuploide/poliploides: ésta es una característica que se encuentra generalmente en las levaduras industriales que se obtienen del medio natural. El pasado filogenético de estas cepas es el origen de esta particularidad.

- 10 Sin embargo, es una dificultad suplementaria que se plantea cuando se desea alterar/inactivar todas las copias de un gen dado. Sin embargo, esta característica de aneuploidía-poliploidía es, en general, el origen de muchas de las propiedades de interés de las levaduras industriales (tasa de crecimiento, resistencia a diferentes estreses, estabilidad fenotípica).

Además, después de largas investigaciones, la solicitante ha constatado con sorpresa que, con el procedimiento descrito en el presente documento, implementado a partir de la cepa llamada industrial que había seleccionado:

- 15 - la introducción de casetes de expresión y de delección no inducía ninguna inestabilidad genómica en la levadura modificada que ve su patrimonio genético mejorado,
- no era obligatorio regular su actividad XK. Existe en efecto una controversia en la técnica anterior relativa a la sobreexpresión de XKS1 en cepas de laboratorio, por lo tanto mejor definidas, que sugiere que la actividad Xilulocinasa debe estar finamente regulada (Jin y col/ AEM 2003, 69,495-503 frente a Ho y col. 1999, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol.65, págs. 163 - 192).

- 20 En particular, la solicitante ha demostrado que con dicha cepa industrial, es posible realizar:

- la delección de al menos dos copias del gen GRE3 de *S. cerevisiae* (siendo la enzima Gre3p una aldosa reductasa que consume NADPH;H⁺ que se produce en gran parte mediante la parte oxidativa de la vía de las pentosas) en dicha cepa industrial permitió reducir otro tanto el consumo de NADPH;H⁺ por dicha enzima,
- 25 - la sobreexpresión de XKS1 naturalmente, es decir que la etapa c) del procedimiento descrito en el presente documento podría omitirse, dado que XKS1 es un gen endógeno de *S. cerevisiae*. Esta sobreexpresión podría particularmente hacerse posible después de cultivos cíclicos cuando el procedimiento consta de una etapa posterior de evolución dirigida, tal como se describe más adelante,

En ciertas realizaciones preferidas, las casetes a), b) y c) de la etapa (ii) están todas integradas.

- 30 Para sus construcciones, la solicitante examinó, en primer lugar, el efecto del gen XR silvestre de *Pichia stipitis*. Después de la retirada de los marcadores y una etapa de evolución dirigida, obtuvo las cepas EG4 y EG5 depositadas en la CNCM con los N.º CNCM I-4397 e I-4398 el 23 de noviembre de 2010.

- No obstante, incluso si las cepas EG4 y EG5 obtenidas son más rápidas que las cepas EG1 y EG2, éstas producen de media un 50 % más de xilitol. El xilitol conduce a una diversión del carbono y reduce significativamente el rendimiento de conversión del azúcar en etanol, lo que es muy perjudicial teniendo en cuenta la aplicación industrial prevista.

- 35 La solicitante sustituyó a continuación el gen silvestre XR de *Pichia stipitis*, por un gen mutado XRm y constató que es preferible que el gen XRm sea un gen que presenta la siguiente mutación, K270M, o un gen XR mutado que presenta una o varias mutaciones diferentes tales como K270R descrita por Watanabe y col., Microbiol. 2007, 153, 3044-3054, de modo que esta mutación confiera a la enzima codificada utilizar NADH;H⁺ como cofactor preferente en lugar de NADPH;H⁺.

La diferencia entre estas dos xilosa reductasas es que una porta una metionina en posición 270 (K270M) en lugar de un residuo de lisina mientras que la otra porta una arginina (K270R) en lugar de un residuo de lisina.

- 40 La solicitante constató que la modificación K270R reduce la afinidad de XR por NADPH;H⁺ y aumenta su capacidad de utilizar NADH;H⁺. Además, esta modificación induce una disminución de la diversión de la xilosa a xilitol y permite mejorar el rendimiento de conversión de la xilosa en etanol en condiciones de fermentación.

De manera aún más preferida, en esta variante, la clonación del gen XR mutado (XRm), se realiza en copia única.

- También se prefiere en esta variante que dicho al menos un gen de cada etapa de la parte no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato de la etapa (iii) se seleccione entre el grupo constituido por *RPE1*, *RK11*, *TKL1* y *TAL1* y que dicho promotor de un gen de la glucólisis fuertemente expresado durante una fermentación alcohólica se seleccione entre el grupo constituido por el promotor *TDH3* para *RPE1*, *RK11* y *TKL1* y *PGK1* para *TAL1*.

Según características complementarias o alternativas, en el procedimiento de preparación de una cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* descrito en el presente documento:

- el promotor en la etapa (ii) se selecciona entre el grupo constituido por ADH1, ADH2, PGK1, TDH3, PDC2 y GAL1/10, preferiblemente *ADH1*, y el terminador está constituido por *CYC1* o por el terminador propio del gen modificado, como por ejemplo el terminador TAL1 para el gen TAL1.

5 - está prevista una etapa posterior de evolución dirigida que consta de las etapas sucesivas siguientes que consisten en someter la levadura obtenida a

(i) una mutagénesis,

(ii) un crecimiento en cultivos cíclicos en O₂ limitado en un medio que consta de dicha al menos una pentosa, y

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

10 para proporcionar mutantes no deficientes respiratorios de dicha levadura que presenten un crecimiento en anaerobiosis en presencia de un medio que consta de dicha al menos una pentosa.

De forma preferida en esta variante, la mutagénesis de la etapa (i) se realiza en condiciones moderadas, a saber mutagénesis moderada con de 100 a 500 J/cm² y, más preferiblemente, 300 J/cm² de ultravioleta a 254 nm. Estas condiciones conllevan solamente una mortalidad del 10 % de la población sometida a los ultravioleta.

15 La solicitante ha demostrado de este modo, de manera sorprendente, que con una mortalidad controlada tan reducida, está permitido reducir en un factor 10 la duración de la etapa de evolución dirigida mediante cultivos cíclicos necesaria para la obtención de mutantes capaces de fermentar dicha al menos una pentosa. La tasa de supervivencia se determina extendiendo en placas con medio gelosado que contienen un medio nutritivo, un volumen idéntico de la suspensión celular antes y después de la mutagénesis. El número de colonias se determina después de 48 h de crecimiento.

20 De forma preferida, la limitación de O₂ de la etapa (ii) de esta variante se realiza gracias a una sobrepresión parcial en el equipo utilizado (por ejemplo, matraces o fermentadores) debido al CO₂ producido.

Los cultivos cíclicos según esta variante, en las condiciones de fermentación de dicha al menos una pentosa, permiten enriquecer la población en mutantes capaces de fermentar dicha pentosa y esto en un tiempo de 4 a 8 semanas y preferiblemente 6 semanas que es relativamente corto y muy interesante en comparación con lo que se obtendría mediante quimiostato como lo describe Kuyper y col. (2004) 4, 655-664.

25 Aunque el fenotipo deficiente respiratorio "pequeño" pueda concordar con los criterios de fermentación de dicha al menos una pentosa, en esta variante la solicitante realizó una etapa de eliminación de las levaduras "pequeñas" ya que este fenotipo es incompatible con los procedimientos de producción de levaduras industriales en el sentido de la invención.

30 La presente invención tiene por objeto la cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* EG3 obtenida directamente mediante el procedimiento descrito en el presente documento antes de la etapa de evolución dirigida y que consiste en la cepa de levadura depositada el 14 de abril de 2010 en la C.N.C.M (colección nacional de cultivos microbianos del instituto Pasteur) con el N.º I-4295 en las condiciones del tratado de Budapest.

35 La presente invención tiene también por objeto la cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* EG2 obtenida directamente mediante el procedimiento descrito en el presente documento después de la etapa de evolución dirigida y que consiste en la cepa de levadura depositada el 14 de abril de 2010 en la C.N.C.M (colección nacional de cultivos microbianos del instituto Pasteur) con el N.º I-4294 en las condiciones del tratado de Budapest.

40 La presente invención también tiene por objeto la cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* EG1 obtenida directamente mediante el procedimiento descrito en el presente documento después de la etapa de evolución dirigida y que consiste en una variante incapaz de esporular de la cepa de levadura EG2 y depositada el 14 de abril de 2010 en la C.N.C.M (colección nacional de cultivos microbianos del instituto Pasteur) con el N.º I-4293 en las condiciones del tratado de Budapest.

45 Una cepa incapaz de esporular presenta una ventaja en términos de protección del medio ambiente, ya que suprime el riesgo de diseminación de los transgenes por conjugación con otras levaduras del medio circundante. Esta característica es tanto más importante cuando los microorganismos genéticamente modificados se utilizan a muy gran escala.

50 La presente invención también tiene por objeto la cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* EG9 obtenida directamente mediante el procedimiento descrito en el presente documento después de la etapa de evolución dirigida y que consiste en la cepa de levadura depositada el 1 de marzo de 2011 en la C.N.C.M (colección nacional de cultivos microbianos del instituto Pasteur) con el N.º I-4450 en las condiciones del tratado de Budapest.

Más preferiblemente,

- una cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* obtenida está práctica o totalmente libre de marcadores particularmente de resistencia a antibióticos.

Las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* preparadas según la presente invención, según los criterios definidos anteriormente, conservaron, después de la introducción de modificaciones genéticas y otras mutaciones generadas durante la etapa de evolución dirigida, sus características genotípicas y fenotípicas después de un procedimiento industrial completo de producción. En particular, las levaduras producidas presentan una cinética de producción de alcohol, una cinética de consumo de xilosa y una cantidad máxima de alcohol producida rigurosamente idénticas a la cepa de levadura antes de la aplicación de un procedimiento industrial completo.

Por otra parte, las características industriales de la cepa seleccionada antes de la manipulación, tal como se han descrito anteriormente (tasa de crecimiento, rendimiento de producción, aptitud para el secado) permanecen inalteradas.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de producción de etanol, a partir de un medio que consta de al menos una pentosa, por fermentación con ayuda de una levadura según la invención, mencionada anteriormente. El presente documento describe también un procedimiento de producción de etanol, a partir de un medio que consta de al menos una pentosa, por fermentación con ayuda de una levadura tal como se obtiene mediante un procedimiento como se acaba de describir anteriormente.

De forma preferida, el procedimiento de producción de etanol presenta las características alternativas y/o complementarias siguientes:

- el procedimiento consta de una etapa de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) en presencia de polímeros de hexosas, constituidos mayoritariamente por glucosa, y de al menos una enzima capaz de hidrolizarlos,
- dicha al menos una pentosa es la xilosa,
- dicho medio se selecciona entre el grupo constituido por, hidrolizados de lignina, de celulosa, de hemicelulosa, de dextrinas.
- las velocidades medias de liberación de las hexosas, mayoritariamente de glucosa, son del orden de 2,8 a 5,6 g/l/h con una concentración extracelular de hexosa, mayoritariamente de glucosa, nula.

La solicitante implementó el procedimiento de producción de etanol según la invención en las condiciones reales de SSF (fermentación y sacarificación simultáneas), tal como se practican en la industria para la producción de etanol, particularmente en los EE. UU.

Las concentraciones de azúcares empleadas (70 g/kg de xilosa y 130 g/kg de equivalente de glucosa) son, en conocimiento de la solicitante, las concentraciones máximas que pueden encontrarse en la práctica. Todos los ensayos publicados que hacen referencia a la fermentación de la xilosa se realizaron con concentraciones claramente inferiores de azúcares totales.

Otras características y ventajas de las cepas y de los procedimientos descritos en el presente documento serán aún más evidentes con la lectura de la descripción detallada a continuación, que consta de ejemplos de realización con tablas de resultados que se dan a título puramente ilustrativo y no limitante, y para cuya comprensión, se deben consultar los dibujos adjuntos en los que:

- la figura 1 ilustra un vector de sobreexpresión de la XDH de *Pichia stipitis*,
- la figura 2 es un gráfico que muestra la glucosa liberada por hidrólisis enzimática en función del tiempo según tres condiciones de liberación inicial (A): 2,8 g/l/h, (B): 3,9 g/l/h y (C): 5,6 g/l/h,
- las figuras 3 a 5 muestran, para una cepa según la invención EG3, la evolución de las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol, xilitol, glicerol a lo largo del tiempo, la figura 3 corresponde a la dosis de enzima A, la figura 4 a la dosis de enzima B y la figura 5 a la dosis de enzima C,
- las figuras 6 a 8 muestran, para aún otra cepa según la invención EG1, la evolución de las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol, xilitol, glicerol a lo largo del tiempo, la figura 6 corresponde a la dosis de enzima A, la figura 7 a la dosis de enzima B y la figura 8 a la dosis de enzima C,
- la figura 9 muestra la evolución de las medias móviles de las velocidades de consumo de xilosa por cada una de las dos cepas EG1 y EG3 durante los tres ensayos realizados en función de la media móvil de las concentraciones de glucosa en el medio en el mismo intervalo de tiempo,
- la figura 10 es un gráfico que ilustra la velocidad específica de producción de xilitol (g/l/h) en función de la velocidad específica de consumo de xilosa en el medio (g/l/h) para las dos cepas EG1 y EG3,

- la figura 11 es un gráfico que ilustra la pérdida de masa en función del tiempo de fermentación en presencia de xilosa (70 g/l) por los 2 productos de evolución EG3 y EG2 (la cepa Ethanol Red™ es la cepa de partida).
- La figura 12 ilustra la evolución de la pérdida de masa observada durante la fermentación de la xilosa por las cepas EG5 y EG9. Las células se inocularon a la altura de 1 g/kg de materia seca en un medio que contiene 70 g/kg de xilosa. La fermentación se realizó a 32 °C.

Ejemplos

Ejemplo 1

La selección de la cepa industrial es tal como se ha descrito en la descripción anteriormente.

Todas las secuencias de ADN que se utilizaron para las diferentes transformaciones que pretenden la sobreexpresión de un gen se obtuvieron a partir de un vector tipo conocido (tipo pUC de *E. coli*) en el que se presentaron:

- las dianas de integración;
- los promotores/terminadores seleccionados por gen de interés y
- los marcadores de resistencia que se eliminarán a continuación (véase a continuación).

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

Para la alteración de las copias del gen GRE3 de la cepa industrial seleccionada, la solicitante utilizó amplificadores por PCR a partir de un plásmido de tipo pUG6 (Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. Nucleic Acids Res. 1 de julio de 1996; 24(13): 2519-2524).

La etapa de transformación de la levadura se implementó según Gietz, R.D. y R.A. Woods. (2002) Transformation of yeast by the Liac/SS Carrier DNA/PEG method. Methods in Enzymology 350: 87-96.

Las cepas de levadura según la invención, respectivamente EG1, EG2 y EG3 se depositaron en la CNCM a fecha del 14 de abril de 2010 y se les atribuyeron los Números I-4293, I-4294 e I-4295 respectivamente.

Las cepas según la invención poseen, según un modo preferente, el siguiente genotipo:

Ethanol Red™, BUD5::ADH1p-PsXRm (K270M)-CYC1t; HO::ADH1p-PsXDH-CYC1t; BUD5::ADH1p-XKS1-CYC1t; RPE1::TDH3p-RPE1-CYC1t; RKI1::TDH3p-RKI1-CYC1t; TKL1::TDH3p-TKL1-CYC1t; TAL1::PGK1p-TAL1 -CYC1t; ΔGRE3

Ejemplo 2

La mutagénesis de las cepas obtenidas en el ejemplo anterior se realizó de manera moderada, a saber de 100 a 500 J/cm² y preferiblemente a 300 J/cm² de ultravioleta a 254 nm.

Después de una semana de cultivo a 32 °C en un medio tipo YE (Yeast Extract 0,5 %) que contenía el 7 % de Xilosa en agitación, sin aireación - realizándose la limitación en O₂ gracias a una sobrepresión parcial en los matraces debida al CO₂ producido durante la fermentación - un ml del cultivo se utiliza para re-sembrar el mismo medio. Esta operación se repite 6 veces. Las células se extienden finalmente sobre medio gelosado YE Glucosa a 20 g/l. Se extraen colonias aisladas y a continuación se cultivan sucesivamente en:

- YE Glicerol a 20 g/l y en aerobiosis para eliminar los mutantes "pequeño" es decir deficientes respiratorios;
- YE Glucosa para verificar su velocidad de crecimiento;
- YE Xilosa para identificar los clones más interesantes.

Ejemplo 3

La solicitante ensayó en primer lugar en cultivo por lotes anaerobio las cepas genéticamente modificadas de modo que sean capaces de convertir la xilosa en etanol tales como las obtenidas en el ejemplo 2. La solicitante pudo medir la Km aparente para la xilosa midiendo la velocidad de producción de CO₂ en función de la concentración de xilosa y esto durante la fermentación de xilosa como única fuente de carbono: ésta es de 6,16 M.

Entre las cepas ensayadas, se seleccionan tres en condiciones de SSF para evaluar su capacidad para metabolizar la xilosa al mismo tiempo que la glucosa. Los ensayos de SSF se realizaron con dosis de enzimas bajas cuya actividad está comprendida entre 4,3 y 8,6 μKat para que la velocidad de liberación de la glucosa sea baja y que la concentración de glucosa residual durante la fermentación sea nula.

Las cepas ensayadas fueron la cepa EG3 y la cepa EG1 obtenidas respectivamente antes y después de la etapa de evolución dirigida.

Las células de la cepa EG1 son incapaces de esporular. La capacidad de esporular de estas células se determina por observación microscópica de tétradas o de ascas obtenidas cultivando las células 48 h en un medio pobre de tipo SAA (acetato de sodio 0,8 %, agar 1,5 %).

Condiciones de los ensayos.

Los ensayos se realizaron a 32 °C, pH 5. La siembra fue de 0,5 g de materia seca de levadura por kg de mosto inicial. La liberación enzimática progresiva de glucosa se obtuvo mediante utilización de dextrinas y adición de glucoamilasa. Las dosis de glucoamilasa utilizadas fueron bajas (comprendidas entre 4,3 μ kat y 8,6 μ kat) para simular una cinética de hidrólisis de la celulosa por celulasas que tiene lugar en 72 h. Las velocidades de liberación inicial de glucosa ensayadas fueron respectivamente de (A): 2,8 g/l/h, (B): 3,9 g/l/h y (C): 5,6 g/l/h.

Como se observó generalmente, la cinética de hidrólisis disminuye cuando el 60-70 % de las dextrinas se hidrolizaron y las velocidades medias de liberación de glucosa son, a continuación, del orden de 0,4-0,45 g/l/h para las tres condiciones con una velocidad ligeramente más rápida con la condición A. (figura 2).

En la práctica, el medio utilizado es un medio sintético que contiene el extracto de levadura (5 g/kg), urea (2,5 g/kg), fosfato dipotásico (1 g/kg), un tampón citrato 12 mM así como minerales y vitaminas.

Resultados obtenidos

Cepa EG3.

Las figuras 3 a 5 dan la evolución de las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol, xilitol, y de glicerol a lo largo del tiempo. Estas figuras muestran que en 72 h:

- la cepa EG3 consumió entre 30 y 33 g de xilosa según los ensayos mientras que casi no la consumía en lotes de xilosa.
- se produjeron 17 a 20 g de xilitol en los 30-33 g de xilosa consumidos es decir una relación de 0,5 g/g para la condición A y una relación de 0,6 g/g para las condiciones B y C.
- las cantidades de glicerol producido fueron bajas, más bajas que las cantidades esperadas en este tipo de ensayo.

Globalmente, los tres ensayos dieron resultados equivalentes.

TABLA 1: Moléculas producidas y consumidas por la cepa EG3 (en g por kg de medio inicial a las 72 h)

Dosis de enzima	Glucosa	xilosa	Biomasa	Xilitol	glicerol	Etanol	Balance de carbono
A	103,3	32,8	10	17,0	1,1	51,7	101 %
B	114,4	33,2	10	19,6	1,6	57,7	103 %
C	122,2	30,9	10	17,9	2,5	60,6	103 %

Cepa EG1

Las figuras 4 a 6 dan la evolución de las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol, xilitol, y de glicerol a lo largo del tiempo. Estas figuras muestran que en 72 h:

- la cepa EG1 consumió entre 45 y 60 g de xilosa según los ensayos es decir casi dos veces más que la cepa EG3.
- se produjeron de 10 a 13 g de xilitol en los 45-60 g de xilosa consumidos, es decir una relación de 0,2 g/g para los tres ensayos
- las cantidades de glicerol producido fueron bajas pero más elevadas que con la cepa EG3.

Globalmente, los tres ensayos dieron resultados equivalentes.

TABLA 2: Moléculas producidas y consumidas por la cepa EG1 (en g por kg de medio inicial a las 72 h)

Dosis de enzima	glucosa	xilosa	Biomasa	Xilitol	glicerol	Etanol	Balance de carbono
A	102,5	60,61	10	12,74	2,86	65,49	100 %
B	115,6	51,65	10	11,90	4,17	69,34	102 %
C	120,9	45,96	10	9,86	5,33	70,18	103 %

Comentarios/hipótesis sobre los resultados obtenidos, particularmente relativos a la concentración de glucosa que permite la captación de xilosa.

5 Los resultados obtenidos en lote de glucosa-xilosa muestran una ruptura de pendiente de pérdida de masa que parece indicar que la glucosa se consumía en primer lugar y a continuación que la xilosa se consumía a una velocidad mucho más lenta.

El ensayo SSF tal como se realizó en el ejemplo permite evaluar si la captación de xilosa sería mayor en flujo entrante de glucosa no nulo, pero concentración de glucosa nula.

10 La figura 9 muestra la evolución de las medias móviles de las velocidades de consumo de xilosa por cada una de las dos cepas durante los tres ensayos realizados en función de la media móvil de las concentraciones de glucosa en el medio en el mismo intervalo de tiempo.

Los resultados permiten constatar:

- que hay consumo de xilosa por las cepas ensayadas hacia 5 g/kg de glucosa en solución,
- que la velocidad de consumo de la xilosa observada con la cepa EG3 es 2 veces más baja que las observadas con la cepa EG1.

En una variante preferida del procedimiento de producción de etanol según la invención, tal como se presenta en el ejemplo, la liberación lenta y controlada de glucosa permite a las células no experimentar una fuerte variación de presión osmótica y evitar la obstrucción de las vías fermentativas (glucólisis, pentosas fosfato, y transportadores de azúcares) que limitaría la utilización de la xilosa.

20 De manera sorprendente y destacable, con el procedimiento según la invención, las células son capaces de metabolizar 62 g/l de xilosa en 50 horas en un medio muy rico en fuentes de carbono del orden de 200 g/l (ejemplo realizado con 130 g/l de equivalente de glucosa y 70 g/l de xilosa). Estas condiciones tan drásticas no se han descrito nunca, a conocimiento de los inventores.

De acuerdo con los ensayos SSF realizados:

- 25 - la velocidad específica de la cepa EG1 es de 0,5 g xilosa/g MS de levadura/h.
- se formaron 12,74 g de xilitol para 60,61 g de xilosa consumida, es decir una relación de 21 g/100 g.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada entre la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* EG3 depositada con el N.º I-4295 en la CNCM el 14 de abril de 2010, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* EG2 depositada con el N.º I-4294 en la CNCM el 14 de abril de 2010, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* EG1 depositada con el N.º I-4293 en la CNCM el 14 de abril de 2010 y la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* EG9 depositada con el N.º I-4450 en la CNCM el 1 de marzo de 2011.
2. Procedimiento de producción de etanol, a partir de un medio que consta de al menos una pentosa, por fermentación de una levadura según la reivindicación 1.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que consta de una etapa de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) en presencia de polímeros de hexosas, constituidos mayoritariamente por glucosa, y de al menos una enzima capaz de hidrolizarlos.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizado por que dicha al menos una pentosa es xilosa.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado por que dicho medio se selecciona entre el grupo constituido por hidrolizados de lignina, de celulosa, de hemicelulosa y de dextrinas.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que las velocidades medias de liberación de hexosas, mayoritariamente de glucosa, son del orden de 2,8 a 5,6 g/l/h con una concentración extracelular de hexosa, mayoritariamente de glucosa, nula.

FIGURA 1

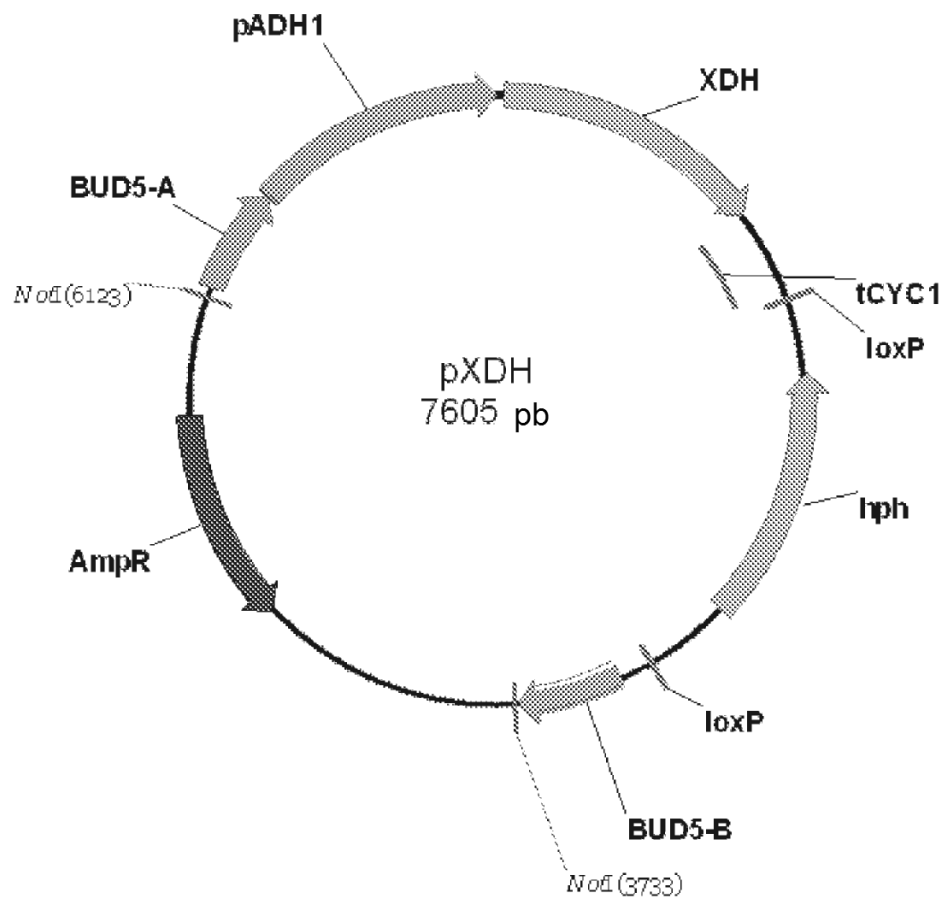


FIGURA 2

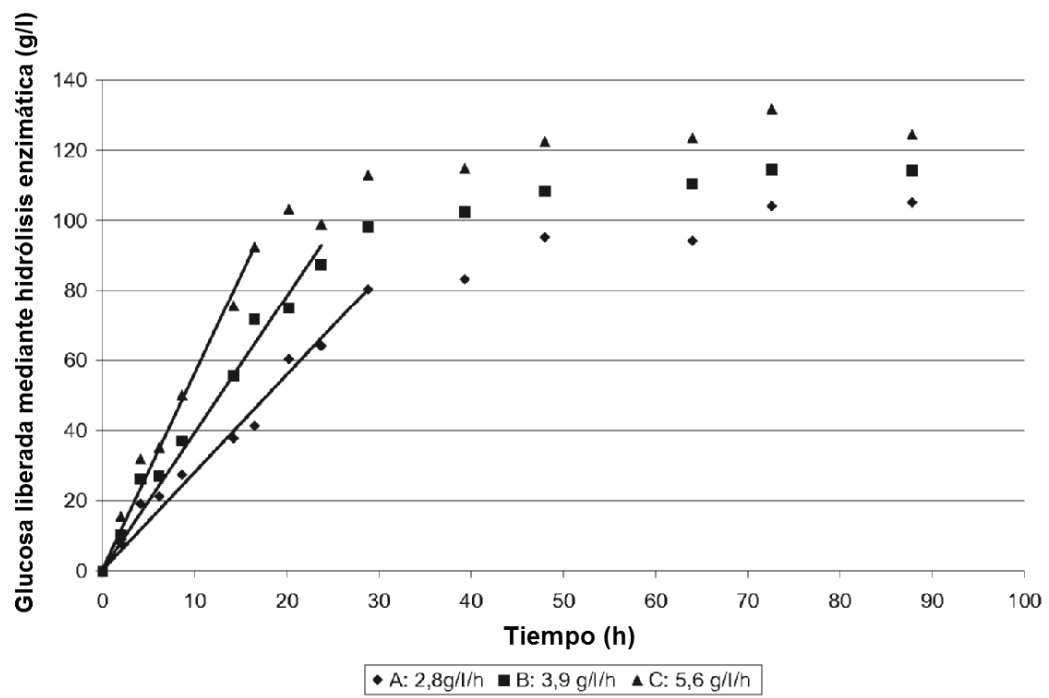


FIGURA 3

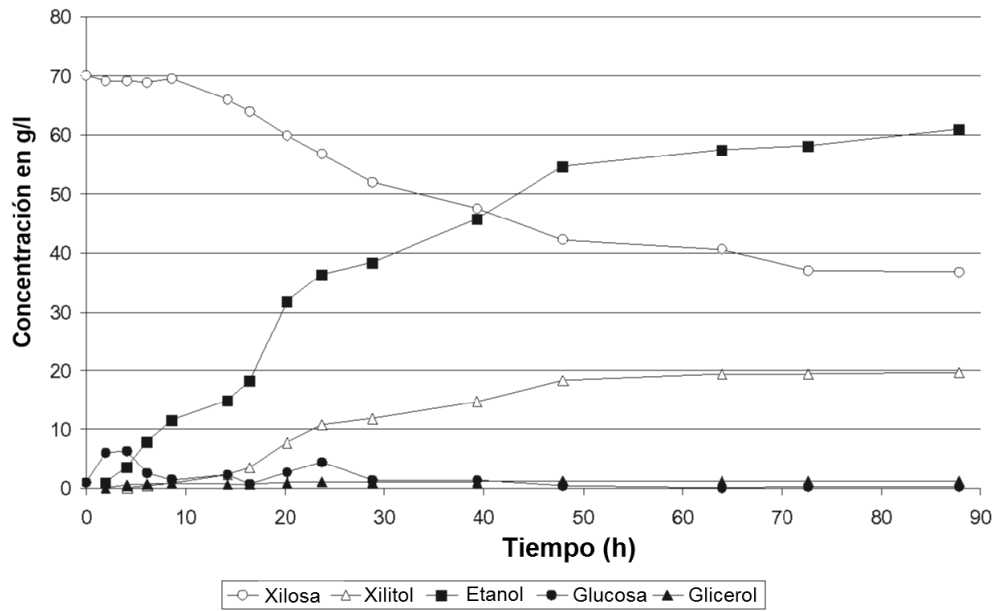


FIGURA 4

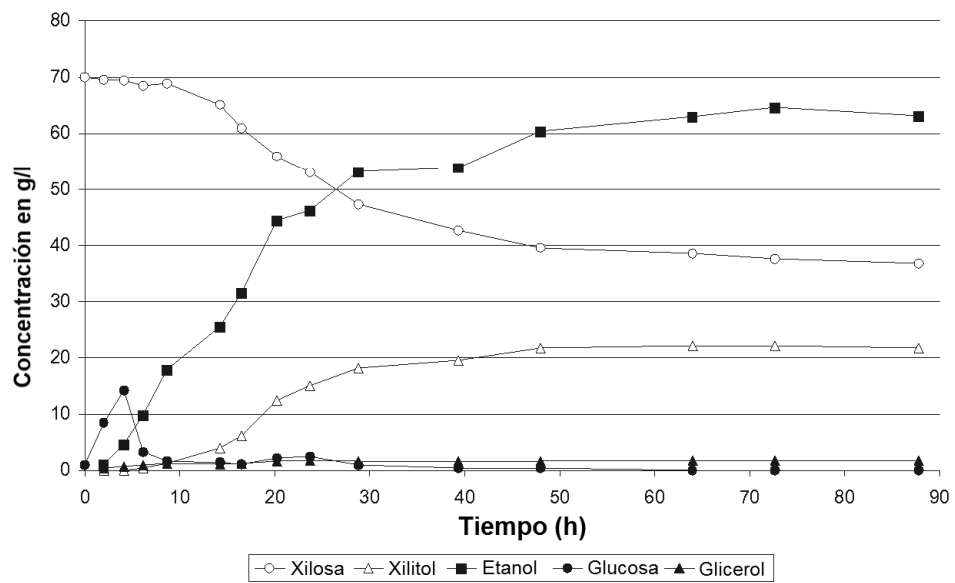


FIGURA 5

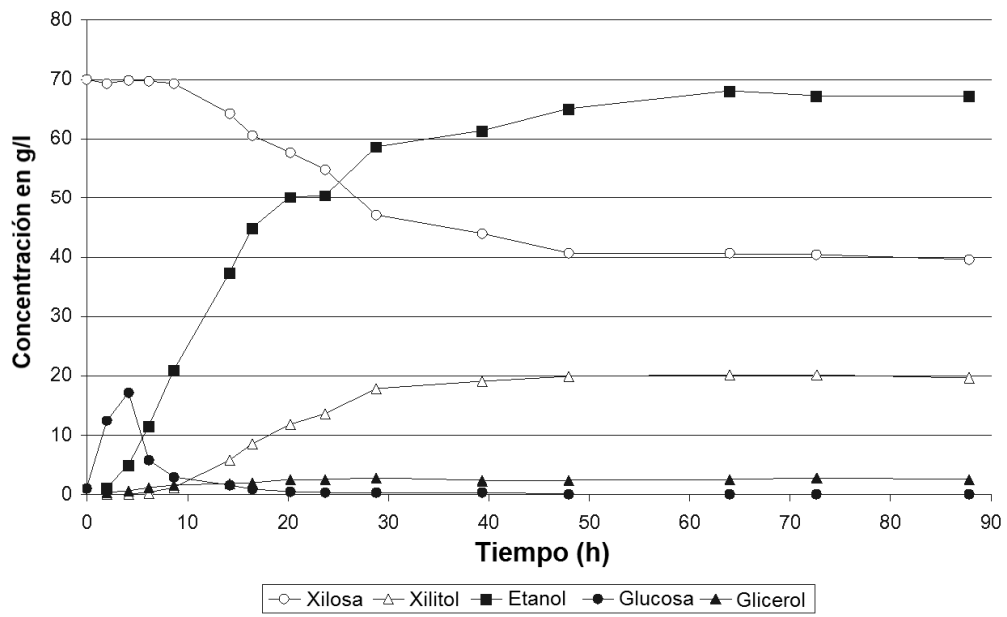


FIGURA 6

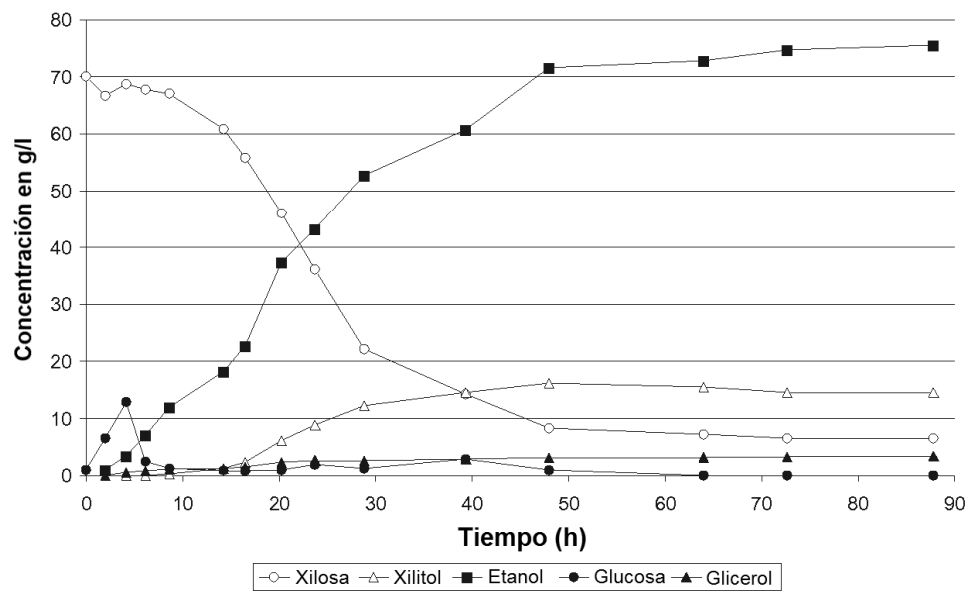


FIGURA 7

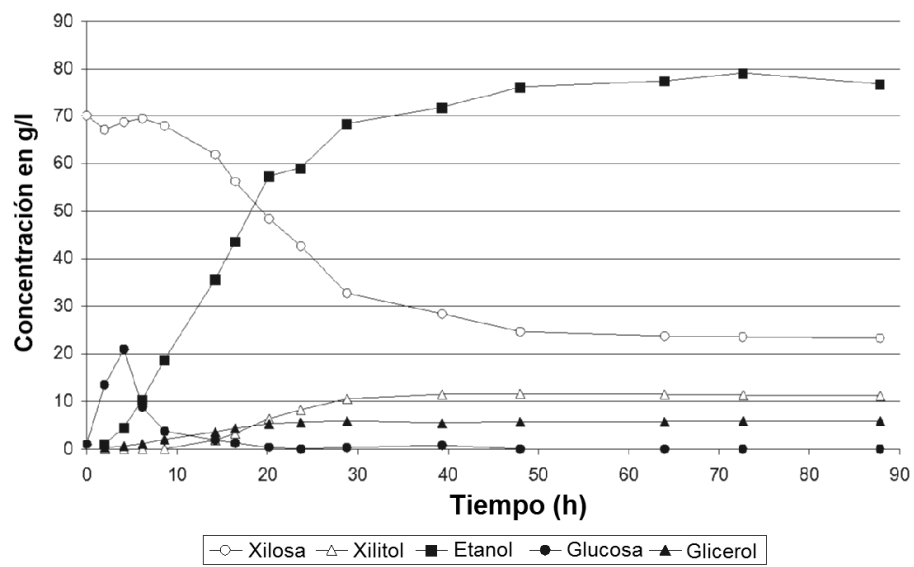


FIGURA 8

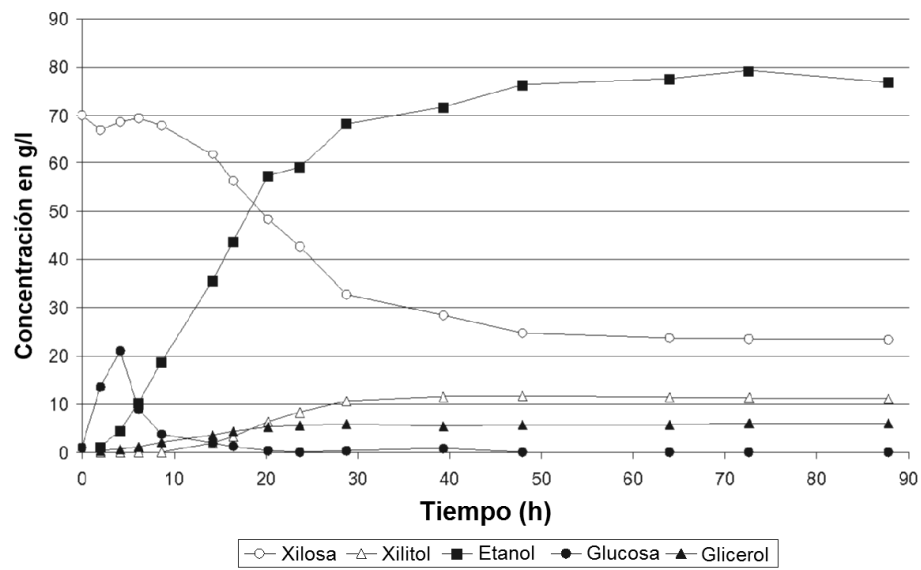


FIGURA 9

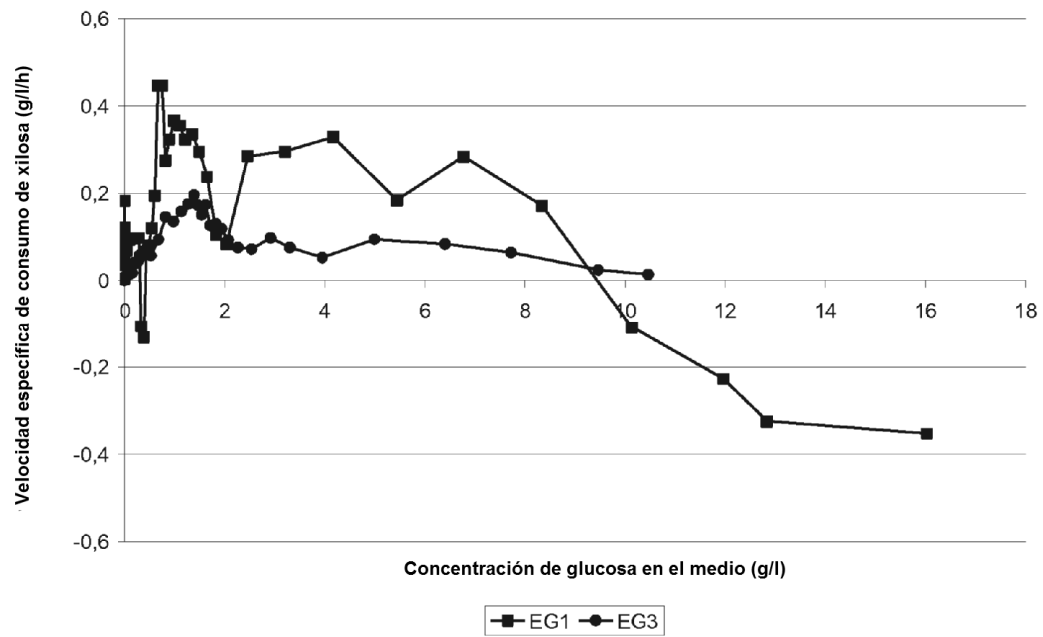


FIGURA 10

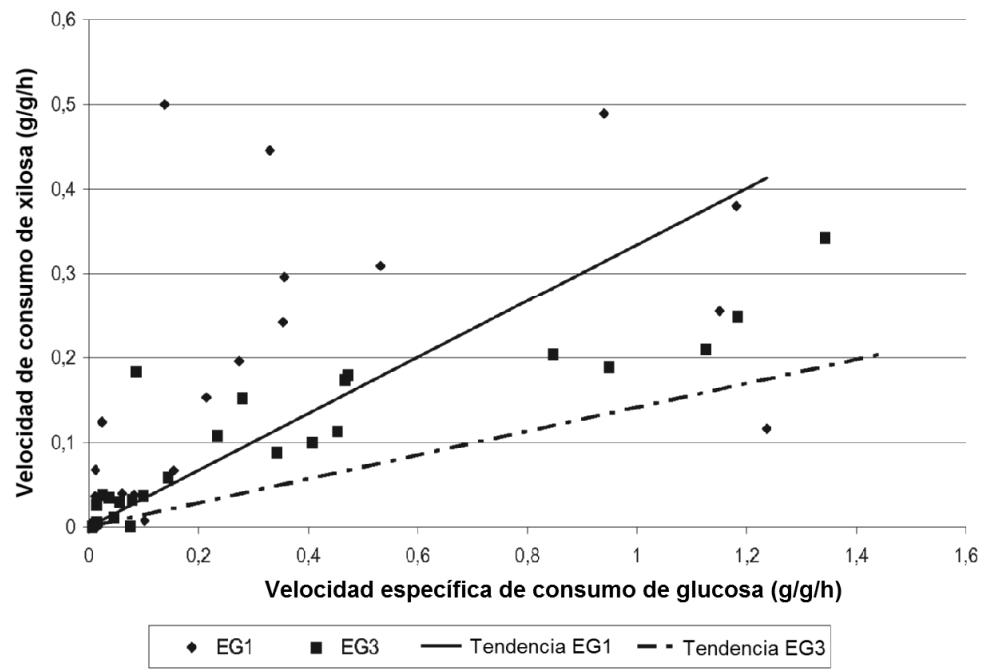


FIGURA 11

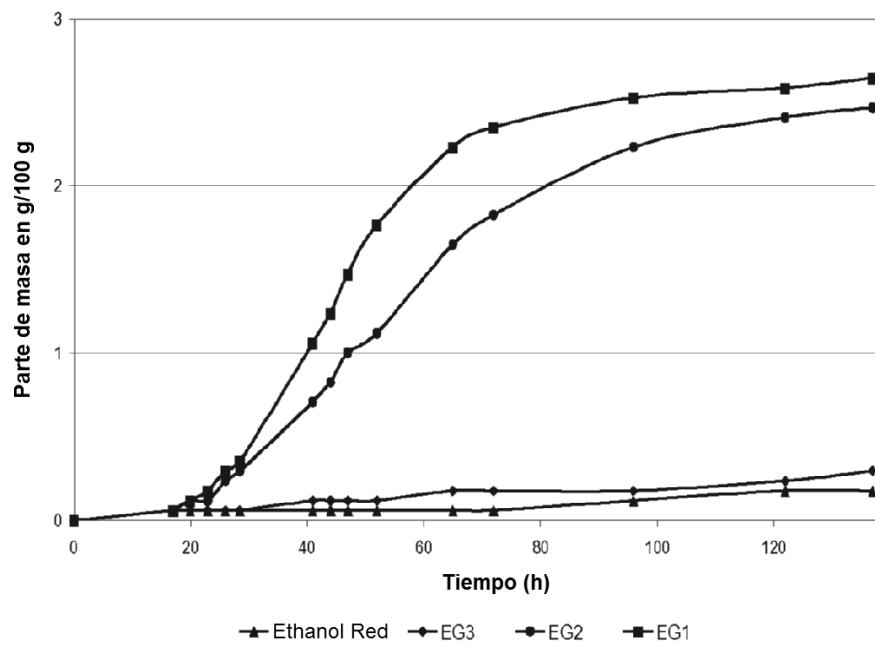


FIGURA 12

**Evaluación de la pérdida de masa en función del tiempo de fermentación en YFX
(xilosa inicial = 70 g/kg inoc = 1 g eq DM/kg)**

