

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 913**

51 Int. Cl.:

C12N 15/01 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

C12R 1/85 (2006.01)

C12G 1/022 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C12P 7/04 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2010 E 10800786 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2501809**

54 Título: **Método para amplificar la vía de las pentosas fosfato en cepas de levaduras, levaduras obtenidas y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

20.11.2009 FR 0905585

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

30.04.2015

73 Titular/es:

**DANSTAR FERMENT AG (50.0%)
Bahnhofstrasse 7
6301 Zug, CH y
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DEQUIN, SYLVIE;
ORTIZ-JULIEN, ANNE y
CADIERE, AXELLE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 534 913 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

Método para amplificar la vía de las pentosas fosfato en cepas de levaduras, levaduras obtenidas y sus aplicaciones

5 La invención tiene por objeto un método para aumentar el flujo a través de la vía de las pentosas fosfato (VPP) y las levaduras así obtenidas. Se refiere asimismo a las aplicaciones de estas levaduras, en particular en las industrias de fermentación.

10 Estando la VPP en el centro del metabolismo carbonado y redox de la levadura, una amplificación de esta vía presenta un interés para conducir a una remodelación metabólica significativa y así conferir nuevas propiedades a la levadura.

15 La obtención de una cepa de levadura que tiene una VPP amplificada se puede prever a través de diferentes estrategias.

20 Estos los últimos años se han desarrollado numerosos enfoques con el objetivo de obtener unas cepas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar las pentosas. Así, se han obtenido unas cepas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar la xilosa en etanol mediante expresión de los genes heterólogos que permiten su asimilación (Eliasson *et al.*, 2000). Sin embargo, la formación de etanol por estas cepas sigue siendo limitada debido a la secreción de una parte de la xilosa consumida en forma de xilitol. La acumulación de xilitol podría proceder de la limitación del flujo a través de la parte no oxidativa de la VPP en *S. cerevisiae*. En efecto, los estudios sobre los mutantes que poseen una mejor capacidad para metabolizar la xilosa han mostrado un aumento de la actividad de su transaldolasa o su transcetolasa, o bien las dos (Becker *et al.*, 2003; Sonderegger *et al.*, 2005; Pitkanen *et al.*, 2005). Además, la delección de uno de los dos genes (*ZWF1*, *GND1*) que codifican las enzimas NADPH dependientes del segmento oxidativo permite disminuir también el rendimiento de la producción de xilitol y aumentar el rendimiento de etanol (Eliasson *et al.*, 2000; Jeppsson *et al.*, 2002).

30 La selección de mutantes por evolución dirigida constituye una alternativa a los enfoques de ingeniería metabólica. Este enfoque se basa en la selección de variantes, obtenidas por mantenimiento de una cepa durante numerosas generaciones en condiciones selectivas para forzar la adaptación. Este principio de selección fue elegido por los inventores que, de manera sorprendente, han conseguido seleccionar unas variantes que tienen acumuladas unas mutaciones que permiten una amplificación significativa de la VPP. Estas mutaciones permiten degradar más gluconato y confieren a las cepas unas propiedades nuevas, totalmente inesperadas (reducción de la producción de acetato, aumento de la de los ésteres, necesidades en nitrógeno reducidas).

35 Por lo tanto, la invención tiene como objetivo proporcionar un método de obtención de mutantes de levaduras en los que la VPP está amplificada con respecto a una cepa parental.

40 Pretende también proporcionar unos mutantes de levadura cuyo metabolismo, de manera inesperada, se ha remodelado con respecto a las cepas parentales, tras la amplificación de la vía VPP.

La invención pretende además aprovechar las propiedades de estas levaduras, en particular en las industrias de fermentación.

45 El método de obtención de cepas mutantes de levaduras según la invención se caracteriza por que comprende el cultivo de las cepas sobre un sustrato a base de un derivado glucónico, más particularmente de una sal de ácido glucónico (siendo tal sal designada en lo sucesivo de manera abreviada por el término "gluconato").

50 De manera ventajosa, el gluconato se incorpora en la VPP a nivel de la 3ª etapa.

El cultivo de las cepas se efectúa a fin de permitir su adaptación en condiciones de cultivo desfavorables, durante al menos 10 generaciones, a una temperatura de incubación de 16°C a 32°C, preferentemente de 28°C, bajo agitación.

55 Los mutantes que han acumulado unas mutaciones que permiten una amplificación de la VPP son ventajosamente seleccionados mediante un ensayo de crecimiento y se recuperan los que tienen una densidad óptica (DO) superior a al menos 1,3 veces la de la cepa parental.

60 La invención se refiere también a los mutantes de cepas de levadura que tienen una VPP mejorada con respecto a una cepa parental.

Estos mutantes se caracterizan por que son susceptibles de ser obtenidos por un procedimiento de cultivo que comprende las etapas:

65 - de adaptación de una cepa de levadura, durante al menos 10 generaciones, utilizando como única fuente de carbono un sustrato a base de gluconato,

- de selección de los mutantes que han acumulado unas mutaciones que permiten una amplificación de la VPP, que tienen una DO final de al menos 1,3 veces superior a la de la cepa parental no sometida a las condiciones de adaptación anteriores.

5 Más especialmente, la invención se refiere a los mutantes de cepas de levadura que tienen, con respecto a una cepa parental, una VPP mejorada, una velocidad de fermentación superior y, por lo tanto, un consumo más rápido de glucosa, así como una reducción de la producción de acetato.

10 De manera ventajosa, los mutantes de la invención se caracterizan por una fuerte producción de compuestos aromáticos, tal como el alcohol isoamílico, el acetato de isoamilo, el 2-feniletanol.

Las cepas de levadura pertenecen preferentemente al género *Saccharomyces*, en particular a las especies *cerevisiae*, *Bayanus* o a los géneros no *Saccharomyces*.

15 Las cepas preferidas pertenecen al género *Saccharomyces* y comprenden, en particular, las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces kudriavzevii*.

Otras cepas preferidas pertenecen al género no *Saccharomyces*.

20 La invención se refiere también a los híbridos de las cepas definidas anteriormente.

La invención está dirigida en particular a la cepa adaptada de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM), 25 rue du Dr Roux, Paris, con fines de depósito según el tratado de Budapest, bajo el n° CNCM I-4216, el 29 de julio de 2009.

25 La amplificación de la VPP en las cepas mutantes de la invención permite, en particular:

- una disminución de la producción de etanol

30 - una disminución de la producción de acetato

- una modificación de la producción de ciertos compuestos de aromas

35 - un aumento de la velocidad de fermentación.

Estas propiedades presentan un gran interés para diferentes utilizaciones de la levadura, en particular en las industrias de fermentación.

40 Otras características y ventajas de la invención son dadas en los ejemplos siguientes, en los que se hace referencia a las figuras 1 a 5, que representan, respectivamente,

- las figuras 1 y 2: los resultados de ensayos de crecimiento de una cepa procedente de una adaptación sobre gluconato (I-4216) y de la cepa parenteral (I-4215), sobre medio YNB glucosa (2%) (figura 1) y sobre medio YNB gluconato (2%) (figura 2);

45 - la figura 3, la velocidad de fermentación de estas cepas;

- la figura 4, la distribución de los flujos metabólicos en una cepa de la invención y en una cepa parenteral, y

50 - la figura 5, los histogramas que representan el gluconato residual en el medio.

Adaptación dirigida y modo de cultivo

55 La cepa industrial I-4215 se ha cultivado en unos tubos de 13 ml que contienen 5 ml de medio YNB gluconato [Yeast nitrogen base al 0,67% DIFCO, y gluconato al 2% (Sigma)]. Se realizaron dos cultivos en paralelo. Los cultivos se siembran a una densidad óptica (DO) de 0,1, a partir de un precultivo de una noche sobre YEPD (Bacto Yeast Extract al 1% (Difco), Bacto Peptona el 2% (Difco), glucosa al 2%). Con el objetivo de eliminar cualquier traza de glucosa, las células son centrifugadas y lavadas con agua estéril. El cultivo se realiza durante numerosas generaciones, diluyendo las células por transferencia en un nuevo medio cada 3 generaciones (DO=0,8). Los cultivos son incubados a 28°C bajo agitación (250 rpm). Al ser el crecimiento sobre este sustrato es muy lento, se necesitan 8 días para alcanzar una DO de 0,8.

Análisis de las cepas adaptadas

65 A intervalos regulares, se extienden 200 µl de cultivos sobre una caja que contiene un medio YEPD, a fin de realizar unos ensayos de crecimiento que permitan poner en evidencia una evolución de las cepas. Para ello, el crecimiento

de las cepas procedentes de la adaptación se compara con el de la cepa parental I-4215, sobre YNB gluconato (2%) y sobre YNB glucosa (2%). Los cultivos se siembran a DO 0,1, a partir de un precultivo de aproximadamente 14h sobre YEPD. Los cultivos se realizan en unos matraces erlenmeyers de 250 ml que contienen 50 ml de medio y se incuban a 28°C bajo agitación (250 rpm).

Después de 23, 37 y 79 transferencias, que corresponden a aproximadamente 70, 180 y 240 generaciones, se aislaron unas cepas procedentes de las dos adaptaciones llevadas a cabo en paralelo sobre la evolución de las capacidades de crecimiento en YNB gluconato (2%). Estas cepas son denominadas ECA2 y I-4216 para la selección efectuada en 70 generaciones, ECB2 y ECB5 para la selección realizada en 180 generaciones y ECC2 y ECC5 para la realizada en 240 generaciones (Figura 5).

Su capacidad para consumir el gluconato se representa en la figura 5 (cuadrados negros: biomasa final sobre YNB gluconato; triángulos negros: biomasa final sobre YNB glucosa). Cuanto más prolongada sea la adaptación, más aumenta la capacidad para consumir el gluconato. Sin embargo, la capacidad de estas cepas para multiplicarse sobre glucosa disminuye cuando la adaptación es prolongada.

El conjunto de estas cepas se ensayó en unas condiciones de fermentación enológica sobre MS 70 que contiene 240 g/l de glucosa a 18°C. La cepa I-4216 presenta las mejores capacidades de fermentación (tiempo de fermentación reducido en un 30%), mientras que las cepas ECB2 y ECC2 no terminan su fermentación. Las cepas ECA2, ECB5 y ECC5 presentan un fenotipo de fermentación intermedio entre I-4216 y I-4215. Se realizó entonces un análisis comparativo detallado de las propiedades de las cepas I-4216 y I-4215.

No se ha observado ninguna diferencia de crecimiento sobre YNB glucosa entre esta cepa y I-4215 (Figura 1).

Sin embargo, sobre YNB gluconato, la DO final alcanzada por I-4216 es de 1,3 veces superior a la alcanzada por I-4215 (Figura 2).

Propiedades de fermentación de la cepa adaptada I-4216

Condiciones de cultivos

Se han realizado las fermentaciones en unos reactores de 1,2 litros (SGI, Francia) con un volumen de reacción de 1 litro. Se ha utilizado el medio MS para el precultivo y el cultivo. Se trata de un medio sintético que simula un mosto estándar de uva. El medio MS contiene el 20% de glucosa, 6 g/l de ácido málico, 6 g/l de ácido cítrico, 100 mg/l de nitrógeno, en forma de NH₄Cl (79 mg/l) y de aminoácidos (28 mg/l). El pH del medio MS se ajustó a 3,3 con una solución de NaOH al 32%. Se añaden unos factores de anaerobiosis, ergosterol (7,5 mg/l), ácido oleico (2,5 mg/l) y Tween 80 (0,21 g/l). Los precultivos se realizan en unos matraces erlenmeyers de 250 ml que contienen 50 ml de medio YEPD a 28°C bajo agitación (150 rpm) durante 8h. Estos precultivos se siembran a 0,1 UDO/ml a partir de un precultivo sobre YEPD realizado durante alrededor de 14h. Los reactores se sembraron a partir de los precultivos, con 0,5 millones de células por ml y se mantuvieron a una temperatura constante de 18°C con una agitación permanente (300 rpm).

Métodos analíticos

El crecimiento se controló mediante el recuento del número de células sobre un aparato de tipo Coulter Counter (ZBI) a partir de una fracción alícuota del medio de cultivo.

Los metabolitos se ensayaron en el sobrenadante de cultivo, después de la centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos. Las concentraciones en glucosa, glicerol, etanol, piruvato, succinato, acetato, α -cetoglutarato, se determinaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando una columna de tipo HPX-87H (Bio-Rad).

Las concentraciones en compuestos volátiles (alcoholes superiores y ésteres) se determinaron por cromatografía en fase gaseosa.

Resultados

La cepa I-4216 presenta una velocidad máxima (V_{max}) de fermentación superior a la de I-4215, y consume la glucosa más rápidamente (figura 3).

La tabla 1 siguiente proporciona el balance carbono y redox de las cepas I-4215 e I-4216. Como se destaca del examen de la figura 3, el resultado más destacable se refiere a la cepa I-4216, que termina su fermentación 200 horas antes que la cepa control. Puesto que la cepa adaptada presenta una biomasa final inferior a la de la cepa control (tabla 1), la velocidad específica de fermentación se aumenta, por lo tanto, en gran medida con respecto a la de I-4215

Tabla 1

Compuesto (g/l)	I-4215	I-4216
Glucosa	239 ± 2	239 ± 2
Biomasa	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Etanol	119 ± 2,5	118 ± 4,0
Glicerol	7,4 ± 0,3	7,3 ± 0,7
Piruvato	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Acetato	0,70 ± 0,06	0,35 ± 0,01
2,3-butanodiol	0,4	0,6
Succinato	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Balance Carbono (%)	101	100
Balance redox (%)	103	101

Por otra parte, la cepa adaptada produce menos acetato que I-4215. Esta reducción alcanza un factor 2 (tabla 1).

5 Al ser el acetato la segunda fuente de NADPH después de la VPP, la disminución de la producción de acetato sugiere que el flujo a través de la VPP se aumenta en estas cepas.

10 La obtención de una cepa de baja producción de acetato presenta un interés en enología, en particular en las vinificaciones de mostos blancos muy clarificados.

No se observa ningún efecto destacado en la producción de los otros subproductos. Los balances carbono y redox son equilibrados en las dos cepas (tabla 1).

15 La producción de los compuestos aromáticos se analizó por cromatografía en fase gaseosa. Los resultados obtenidos sobre la producción de aromas se resumen en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

	I-4215	I-4216
Isobutanol	24,5 ± 1,4	29,5 ± 1,2
Alcohol isoamílico	280,6 ± 13	415,4 ± 6,4
2-fenil etanol	90,2 ± 3,9	195,8 ± 0,6
Acetato de isoamilo	0,0 ± 0,0	12,4 ± 0,2

20 Se observaron unos efectos destacados sobre la producción de aromas de la cepa adaptada con respecto a la cepa control (I-4215).

25 La cepa adaptada I-4216 presenta una producción incrementada de alcohol isoamílico y de acetato de isoamilo (1,5 veces superior a EC1118) (Tabla 2). Además, la producción de 2-feniletanol es más elevada en esta cepa (2 veces) (Tabla 2). El feniletanol se produce a partir de la degradación de la fenilalanina. Este aminoácido se sintetiza a partir de un intermedio de la VPP, el eritrosa-4-fosfato. Un aumento de este compuesto es coherente con un aumento del flujo a través de la VPP.

30 Se observa así una modificación importante de las propiedades aromáticas, en parte explicada por un aumento del flujo a través de la VPP.

35 Estas modificaciones presentan un gran interés en enología ya que el acetato de isoamilo y el 2-feniletanol son considerados como unos aromas positivos de los vinos y están asociados al sabor del plátano y de la pera para el primero, y de rosa y de flores para el segundo.

Quantificación del flujo a través de la vía de las pentosas fosfato en la cepa adaptada I-4216

40 El conjunto de las modificaciones observadas muestra que el flujo a través de la vía de las pentosas fosfato se ha ampliado en la cepa adaptada I-4216. Con fines de confirmación y de cuantificación de este efecto, se ha realizado un análisis comparativo ¹³C flujo en I-4216 e I-4215.

Condiciones de cultivos

5 Los cultivos se realizan en frascos de penicilina que contienen 10 ml de medio sintético cuya composición se modifica para que contengan 100 g/l de glucosa, de los cuales el 40% está marcado con ^{13}C sobre el C1 (Euro isótopo) y 1,4 g/l de NH_4Cl como única fuente de carbono.

Los frascos se siembran a 0,01 UDO.

10 Tratamiento de las células

15 A DO 3 (medio de la fase exponencial de crecimiento), las células son centrifugadas. La incorporación de ^{13}C en los aminoácidos se determina después de la hidrólisis ácida de la biomasa y la derivatización como se describe por Gombert *et al.* (2001). El sobrenadante de cultivo se conserva con el objetivo de determinar la producción de subproductos extracelulares por HPLC.

Método analítico

20 La cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masa (GC-MS) se utilizó para determinar la distribución isotópica del carbono en los aminoácidos proteínogénicos obtenidos durante unos cultivos realizados sobre glucosa ^{13}C . El método utilizado es el descrito por Christensen y Nielsen (1999). El análisis se realiza con la ayuda de una GC-MS de tipo GC-17A/GCMS-QP5050A (Shimadzu) que funciona en modo ionización EI (Electron Impact) y a 70 eV. La columna utilizada durante los análisis es de tipo DB-170I (Longitud = 30 mm, ID = 250 μm , film = 0,10 μm) proporcionada por Agilent. El espectrómetro de masa funciona en modo SIM.

25 Análisis y tratamiento de los datos

30 A partir de los datos brutos obtenidos de las mediciones por GC-MS, el porcentaje de incorporación de ^{13}C de cada fragmento se calcula de la manera siguiente: $\text{SFL} = 100 \times [(1.m_1 + 2.m_2 + \dots + n.m_n) \times (m_0 + m_1 + m_2 + \dots + m_n)^{-1}]$, $m_{i>0}$ representa la abundancia de las moléculas que contienen i carbonos marcados.

Además, la concentración de los metabolitos extracelulares producidos se ensaya mediante HPLC.

35 El conjunto de estos datos (SFL y metabolitos extracelulares) se ha utilizado como limitación del modelo matemático (Gombert *et al.* 2001) para cuantificar los flujos en el metabolismo carbonado. Se realizan 50 iteraciones y las distribuciones del flujo que figuran en la figura 4 son la media de 25 distribuciones seleccionadas.

Resultados

40 La distribución de los flujos, estimada en fase exponencial de crecimiento, muestra un aumento considerable del flujo a través de la VPP para la cepa I-4216. En esta fase, se observa una ligera disminución de la producción de etanol (168 y 165 mmoles/100 mmoles de glucosa para I-4215 e I-4216 respectivamente), mientras que el flujo dirigido hacia la biomasa disminuye globalmente en la cepa I-4216 (figura 4). La pérdida de carbonos que resulta de la amplificación del flujo a través de la VPP en la cepa ECA5 parece por lo tanto estar compensada por una disminución al mismo tiempo de la biomasa y del etanol.

Balance de la fermentación de la cepa I-4216 sobre un mosto de Chardonnay

Condiciones de cultivos:

50 Los fermentadores de 100 litros se sembraron con 1 millón de células por ml, a partir de un precultivo en levadura madre líquida de las cepas I-4215 e I-4216. Los medios utilizados para la fermentación y para el precultivo son los mismos (mosto de Chardonnay recogido en 2007). Una oxigenación de 15 mg/l así como una adición de di-amonio hidrogenofosfato (30 g/hl) se realizó después de la velocidad máxima.

Métodos analíticos:

60 Ensayo del etanol: ensayo por densímetro de Paar. Este método consiste en la destilación del vino alcalinizado por una suspensión de hidróxido de calcio (98%) y en la medición de la masa volúmica del destilado. Para esta medición, el destilado se inyecta directamente en un sistema oscilante cuya frecuencia de vibración es modificada por la masa de la sustancia inyectada.

65 Medición de la acidez volátil: después de la destilación por arrastre con nitrógeno a 98°C, los ácidos del vino se ponen en contacto con un reactivo coloreado (el azul de bromofenol) cuyas variaciones de intensidad colorante son proporcionales al contenido en acidez volátil del vino.

Medición de los compuestos de aromas: las concentraciones en compuestos volátiles (alcoholes superiores y ésteres) se determinaron por cromatografía en fase gas Headspace Agilent 6890 equipado de un pasador HP 7694 y de un detector FID.

5 Como se ha observado anteriormente, I-4216 produce menos acidez volátil (incluyendo el acetato) que I-4215 (4 veces menos) (Tabla 3), y produce mucho más compuestos aromáticos tales como el acetato de isoamilo (4 veces más) (Tabla 4).

10 Se observa asimismo una disminución de la producción de etanol en la cepa I-4215. Se traduce por una disminución de su rendimiento de etanol de 0,47 a 0,46 g de etanol/g de azúcar consumido (Tabla 3).

Tabla 3

Muestra	pH	Acidez g/l H ₂ SO ₄	Acidez volátil g/l H ₂ SO ₄	Alcohol % vol	Glucosa + Fructosa g/l	Rendimiento de etanol g de etanol/g de azúcar consumido
I-4215	3,3 ± 0,0	3,9 ± 0,1	0,4 ± 0,0	14,1 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,47 ± 0,00
I-4216	3,3 ± 0,0	3,7 ± 0,1	0,1 ± 0,0	14,0 ± 0,0	1,6 ± 0,0	0,46 ± 0,00

Tabla 4

	I-4215	I-4216
Isobutanol	22,5 ± 0,7	32,23 ± 1,5
alcohol isoamílico	207,3 ± 6,9	250,4 ± 8,8
Acetato de isobutilo	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Acetato de isoamilo	7,2 ± 0,1	33,6 ± 1,9
Butirato de etilo	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Hexanoato de etilo	0,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1

15

Referencias

20 Becker, J. y E. Boles (2003). "A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol." *Appl Environ Microbiol* 69(7): 4144-50.

Blank, L. M., F. Lehmbeck, *et al.* (2005). "Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts." *FEMS Yeast Res* 5(6-7): 545-58.

25 Christensen, B. y J. Nielsen (1999). "Isotopomer analysis using GC-MS." *Metab Eng* 1(4): 282-90.

Eliasson, A., C. Christensson, *et al.* (2000). "Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral médium chemostat cultures." *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3381-6.

30 Gombert, A. K., M. Moreira dos Santos, *et al.* (2001). "Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression." *J Bacteriol* 183(4): 1441-51.

35 Jeppsson, M., B. Johansson, *et al.* (2002). "Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose." *Appl Environ Microbiol* 68(4): 1604-9.

40 Pitkanen, J. P., E. Rintala, *et al.* (2005). "Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain." *Appl Microbiol Biotechnol* 67(6): 827-37.

45 Saint-Prix, F., L. Bonquist, *et al.* (2004). "Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation." *Microbiology* 150(Pt 7): 2209-20.

Sonderegger, M., M. Jeppsson, *et al.* (2004). "Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Biotechnol Bioeng* 87(1): 90-8.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de obtención de cepas mutantes de levaduras que tienen una VPP (vía de las pentosas fosfato) amplificada, caracterizada por que comprende las etapas
- de cultivo de las cepas sobre un sustrato a base de una sal de ácido glucónico,
 - de adaptación durante al menos 10 generaciones, a una temperatura de incubación de 16°C a 32°C, preferentemente de 28°C, bajo agitación,
 - 10 - de selección de las cepas adaptadas que han acumulado unas mutaciones que permiten una amplificación de la VPP, por ensayo de crecimiento, sobre los cultivos que tienen una DO superior a al menos 1,3 veces la de la cepa parental.
- 15 2. Mutantes de cepas de levadura que tienen una VPP amplificada con respecto a una cepa parental, caracterizados por que son susceptibles de ser obtenidos por un procedimiento de cultivo que comprende las etapas:
- de adaptación de una cepa de levadura, durante al menos 10 generaciones, utilizando como única fuente de carbono un sustrato a base de gluconato,
 - 20 - de selección de los mutantes que han acumulado unas mutaciones que permiten una amplificación de la VPP, que tienen una DO final de al menos 1,3 veces superior a la de la cepa parental no sometida a las condiciones de adaptación anteriores, presentando estos mutantes con respecto a una cepa parental un tiempo de fermentación reducido en al menos un 30% y una producción de acetato reducida, en un factor de al menos 2, una producción incrementada, de compuestos aromáticos, tal como el alcohol isoamílico y el acetato de isoamilo, producidos a un índice de al menos 1,5 veces más con respecto a la cepa parental, y de feniletanol producido a un índice de al menos 2 veces más.
 - 25
- 30 3. Mutantes según la reivindicación 2, caracterizados por que pertenecen al género *Saccharomyces*, en particular a las especies *cerevisiae*, *bayanus*, *uvarum* o *kudriavzevii*, de los géneros *Saccharomyces*, o de híbridos.
- 35 4. Cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM), 25 rue du Dr Roux, Paris, con fines de depósito según el tratado de Budapest, bajo el n° CNCM I-4216, el 29 de julio de 2009.
5. Aplicación de las cepas según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en fermentación.

Figura 1

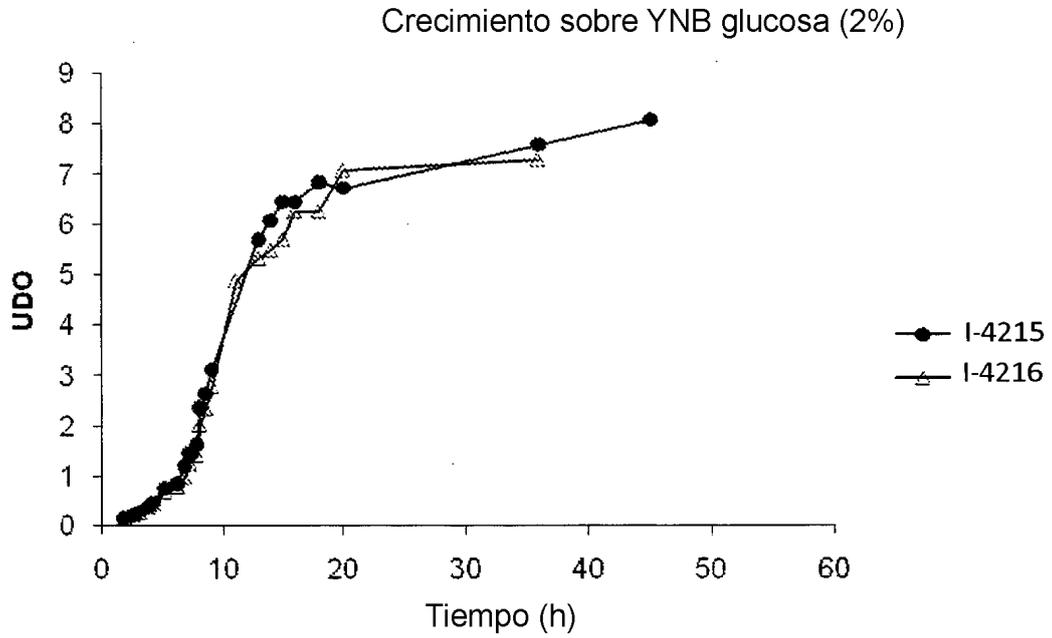


Figura 2

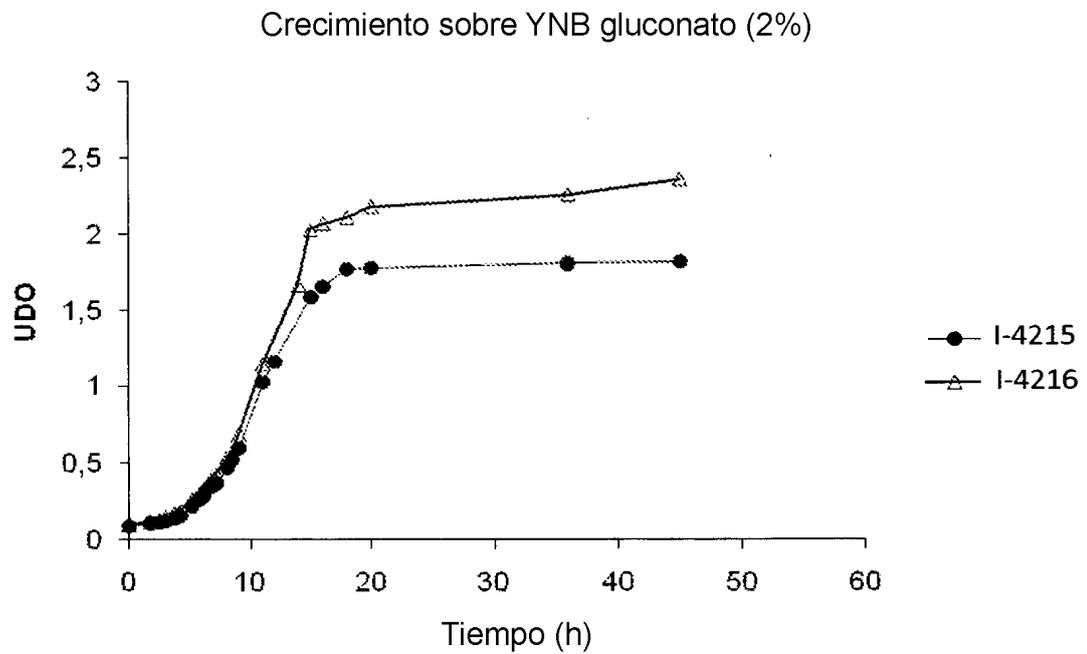


Figura 3

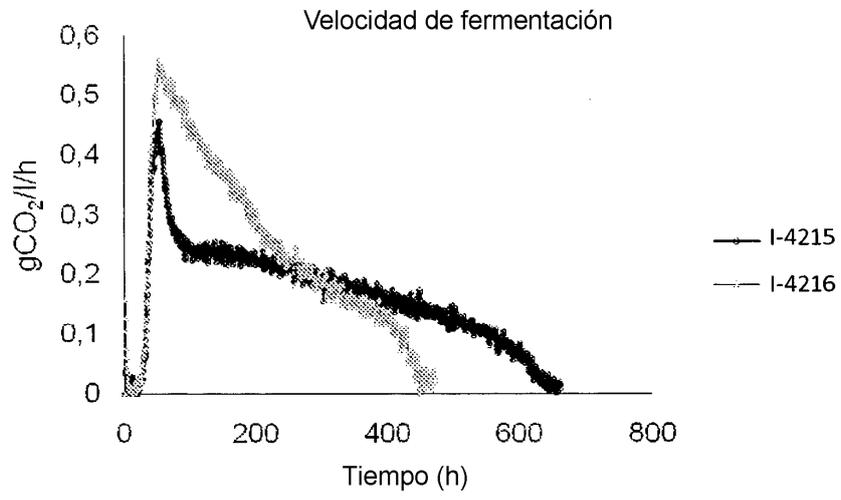


Figura 4

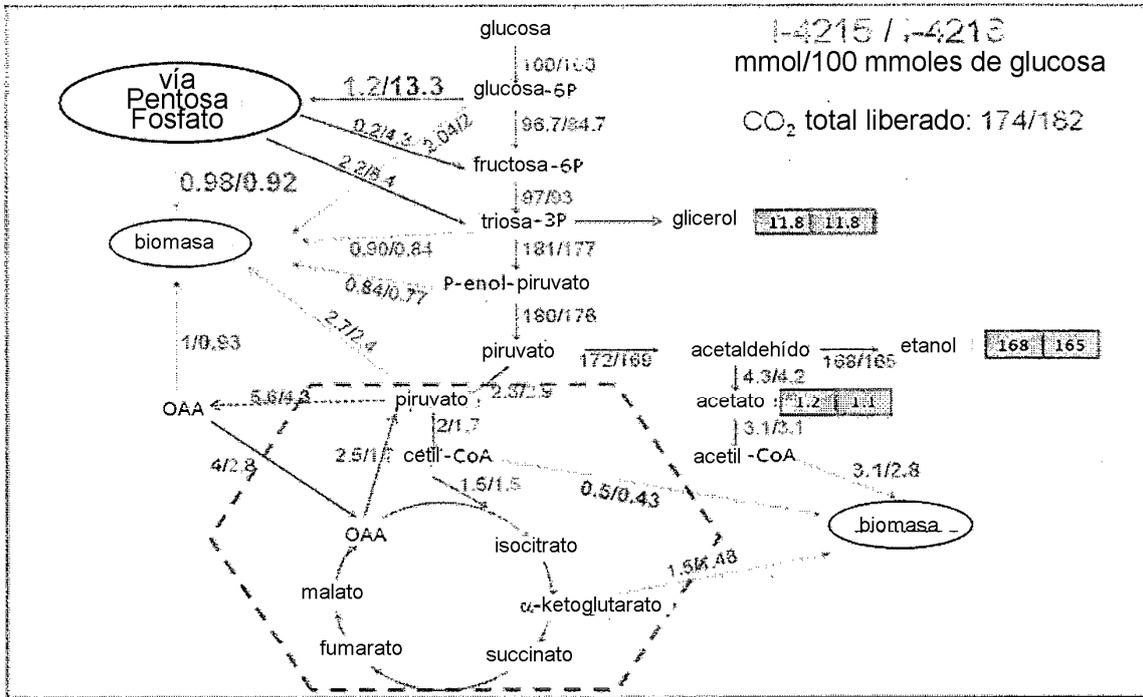


Figura 5

