

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 064**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12P 7/18 (2006.01)

C12G 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2008 E 08763065 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2145004**

54 Título: **Medios para reducir la acumulación de acetoína en unos medios de fermentación alcohólica**

30 Prioridad:

07.05.2007 FR 0703279

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

10.02.2016

73 Titular/es:

DANSTAR FERMENT AG (50.0%)

Bahnhofstrasse 7

6300 Zug, CH y

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE

AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)

72 Inventor/es:

DEQUIN, SYLVIE;

EHSANI, MARYAM;

FÉRNANDEZ GALLEGOS, MARIA ROSARIO;

BIOSCA, JOSEP A. y

ORTIZ-JULIEN, ANNE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 559 064 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

Medios para reducir la acumulación de acetoína en unos medios de fermentación alcohólica

5 La invención tiene por objeto unas levaduras y unos procedimientos de fermentación que utilizan estas levaduras, para reducir la acumulación de acetoína en medios de fermentación alcohólica.

Desde hace quince años, los conocimientos científicos y el saber hacer en viticultura y en zoología han conducido a una mejora muy significativa de las cualidades organolépticas de los vinos. Las prácticas vitícolas actuales favorecen la producción de vinos con potencial cualitativo elevado que retrasa el momento de la vendimia. Resulta, como una consecuencia principal, un aumento del contenido en azúcar de los mostos, y por lo tanto del contenido en alcohol de los vinos (frecuentemente superior a 14°). Esta deriva, encontrada en la mayoría de las zonas de producción, plantea abiertamente numerosos problemas al sector vitícola mundial. Unos contenidos en alcohol excesivos son, en efecto, difícilmente compatibles con las preocupaciones de salud y de bienestar de los consumidores y son, por otro lado, el objeto de tasas en algunos países.

Existe así una demanda creciente para unos métodos y herramientas de reducir el contenido en alcohol de vinos y otras bebidas alcohólicas. Los enfoques físicos (por ejemplo destilación a vacío) son cada vez más utilizadas, pero son difícilmente compatibles con el mantenimiento de una calidad organoléptica satisfactoria.

20 Una solución biológica se basaría en la utilización de cepas de levaduras de bajo rendimiento en alcohol.

Por ejemplo, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, en particular las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* enológicas, transforman los azúcares en alcohol con un rendimiento de 0,47 g/g, que varía poco según la cepa utilizada. Así, la obtención de una levadura *Saccharomyces cerevisiae* de bajo rendimiento en alcohol necesita la utilización de estrategias genéticas que tienen como objetivo desviar una parte de los azúcares hacia la formación de otros sub-productos.

Varios enfoques de ingeniería genética se utilizaron para desviar una parte de los azúcares hacia la producción de otros sub-productos distintos del etanol. Estos enfoques se han basado en la modificación de la actividad de enzimas implicadas en la síntesis de glicerol o de la utilización del piruvato. Por ejemplo, la sobreproducción de glicerol, obtenida por sobreexpresión de *GPD1* o *GPD2* que codifica para la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Michnick *et al.*, 1997; Remize *et al.*, 1999; solicitud de patente internacional WO 96/41888) ha permitido así disminuir el contenido en etanol de 1 a 2°. Se acompaña sin embargo de modificaciones importantes del nivel de producción de otros metabolitos, incluyendo algunas que son indeseables en el vino, en particular el acetato y la acetoína (3-hidroxí-2-butanona). La producción de acetato puede ser reducida por delección de *ALD6* que codifica para una acetaldehído deshidrogenasa. Por el contrario, no se ha descrito aún ninguna estrategia que permita reducir la acumulación de acetonía. Este compuesto está acumulado a razón de varios gramos por litro, mientras que es desfavorable, por ejemplo en el vino, a más de 150 mg/l (límite de detección olfativo).

Remize F. *et al.*, ("Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase", *Applied and Environmental Microbiology*, vol 65, N° 1, enero de 1999, páginas 143-149) describe una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada, en la que el gen *GPD1* que codifica para una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, está sobreexpresado. Esta cepa produce glicerol y 2,3-butanodiol a partir de acetoína.

Cambon B. *et al.*, ("Effects of *GPD1* overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking *ALD6* genes", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, No. 7, 1 de julio de 2006, páginas 4688-4694) describe la utilización de una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobreproductora de glicerol para la producción de vino que tiene un contenido disminuido de etanol. Los autores han evaluado los efectos de la sobreexpresión del gen *GPD1* que codifica para una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en unas cepas de levaduras en las que dos copias del gen *ALD6* se han suprimido. El producto obtenido por estas cepas de levaduras modificadas contiene un alto contenido en acetoína debido a la incapacidad de las cepas para reducir la acetoína en 2,3-butanodiol.

La solución propuesta por los inventores consiste en convertir la acetoína producida en 2,3-butanodiol, compuesto considerado como neutro desde un punto de vista organoléptico, siendo su umbral de detección en el vino superior a 12 g/l.

60 La producción de 2,3-butanodiol a partir de acetoína se realiza por la enzima butanodiol deshidrogenasa (Bdh1p) codificada por *BDH1*.

La vía de producción de 2,3-butanodiol contribuye al equilibrio redox $NAD^+/NADH$ intracelular. En las bacterias, esta vía puede también intervenir en la regulación del pH intracelular.

65 El 2,3-butanodiol es producido en varias formas: (2R,3R)-2,3-butanodiol y (2S,3S)-2,3-butanodiol, dos formas

óptimamente activas, (2R,3S)-2,3-butanodiol y (2S,3R)-2,3-butanodiol, que corresponden a las formas *meso*.

La butanodiol deshidrogenasa codificada por *BDH1* es la principal enzima implicada en la producción de 2,3-butanodiol. Es responsable de la formación de la totalidad del (2R,3R)-2,3-butanodiol y de una parte del (meso)-2,3-butanodiol, a partir de R-acetoína y S-acetoína, respectivamente. Bdh1p tiene, por otro lado, una afinidad más alta para la acetoína ($K_{M_{\text{acetoína}}}$: 4,5 mM, $K_{M_{2,3\text{-butanodiol}}}$: 14 mM), la reacción es fuertemente desplazada en el sentido de la formación de 2,3-butanodiol.

Las publicaciones de Gonzalez E. *et al.*, ("Characterization of a (2R,3R)-2,3-Butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, nº 46, 17 de noviembre de 2000, páginas 35876-35885, y "Characterization and functional role of *Saccharomyces cerevisiae* 2,3-butanediol dehydrogenase", *Chemico-Biological Interactions*, vol. 130-132, nº 1-3, 30 de enero de 2001, páginas 425-434) describen una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que comprende un gen BDH que codifica para una proteína Bdh, que tiene una afinidad incrementada para el cofactor NADH, y en la que el gen BDH está sobreexpresado. En las dos publicaciones de Gonzalez, la cepa de levadura produce 2,3-butanodiol a partir de la acetoína. Sin embargo, las publicaciones de Gonzalez *et al.* no describen cepas de levaduras que comprenden una o varias mutaciones en el gen BDH1 a fin de presentar una especificidad de cofactor para el NADPH en lugar de NADH.

En el enfoque seguido, los inventores han considerado que el nivel de síntesis de la 2,3-butanodiol deshidrogenasa es un factor que limita la reacción de conversión de la acetoína en 2,3-butanodiol. También han recordado el hecho de que una menor disponibilidad en NADH podría impedir una conversión más eficaz de la acetoína. Se llevó a cabo entonces una estrategia de sobreexpresión de *BDH1* y de mutagénesis dirigida de *BDH1* para cambiar su especificidad de cofactor de NADH a NADPH.

Sus trabajos han permitido así transformar unas cepas de *Saccharomyces* y hacerlas capaces de convertir eficazmente acetoína en 2,3-butanodiol durante una fermentación alcohólica, incluso cuando la acetoína está producida en cantidades importantes (varios g/l).

La invención tiene por lo tanto como objetivo proporcionar nuevas cepas de levaduras genéticamente transformadas para sobreexpresar *BDH1* y que presenta una especificidad modificada de cofactor, a fin de producir mayores cantidades de 2,3-butanodiol a partir de acetoína.

La invención tiene también como objetivo un procedimiento de obtención de tales cepas.

Tiene asimismo como objetivo aprovechar unas propiedades de estas cepas de levaduras transformadas en un procedimiento de fermentación alcohólica así como para la producción de 2,3-butanodiol.

Las cepas de levadura de la invención son unas levaduras que sobreexpresan, con respecto a la cepa inicial, el gen *BDH1* que codifica Bdh1p.

Estas cepas están caracterizadas por que catalizan en un medio de fermentación alcohólica la reducción de la acetoína en 2,3-butanodiol según un porcentaje al menos 2 veces superior al de la cepa inicial.

Se trata más especialmente de cepas genéticamente transformadas y/o mutadas a fin de obtener un porcentaje de conversión de acetoína en 2,3-butanodiol de al menos 2 veces superior al de la cepa inicial.

Por "cepa inicial" se entiende una cepa antes de la sobreexpresión o modificación del gen *BDH1*.

La invención tiene así como objetivo unas cepas de levaduras tales como las definidas anteriormente, genéticamente transformadas para sobreexpresar *BDH1*, con la ayuda de secuencias reguladoras adecuadas para aumentar la expresión de dicho gen. Tales cepas transformadas contienen al menos 2 copias del gen *BDH1*. Se puede utilizar cualquier promotor activo en el huésped en el que se desea obtener la expresión de este gen, preferentemente unos promotores descritos como fuertes (que codifican para unos genes fuertemente expresados) en condiciones de fermentación alcohólica. Es el caso, por ejemplo, de genes glicolíticos fuertemente expresados en fermentación como *ADH1* (alcohol deshidrogenasa), *PGK1* (fosfoglicerato quinasa), *TDH3* (gliceraldehído deshidrogenasa), o del factor de transcripción *TEF1*, pero existen muchos otros.

La invención tiene como objetivo también unas cepas en las que el gen *BDH1* comprende una o varias mutaciones a fin de codificar para una proteína Bdh1p en la que uno o varios aminoácidos están mutados.

De manera ventajosa, tales cepas comprenden una o varias mutaciones en el gen *BDH1* a fin de presentar una afinidad incrementada para el cofactor NADPH en lugar del NADH.

La selección de los aminoácidos a modificar se basa en el hecho de que el NAD(H) difiere del NADP(H) en el grupo fosfato esterificado en la posición 2' de la ribosa de adenosina. De este modo, los aminoácidos que interactúan con

este grupo son unos candidatos para el cambio de especificidad de cofactor. El residuo determinante de la especificidad de NAD(H) es el aspartato (Asp) o el glutamato (Glu), que forman unas uniones hidrógeno con los grupos hidroxilo 2' y 3' en la parte ribosilo de la coenzima. Las deshidrogenasas NADP(H)-dependientes tienen un residuo más pequeño y neutro tal como la glicina (Gly), la alanina (Ala), y la serina (Ser), en la misma posición. Además, un residuo de arginina (Arg) adyacente permite una buena interacción con el grupo fosfato de NADP(H).

Así, unas sustituciones ventajosas conformes a la invención se refieren al residuo Glu(E)221 por Ser(S), el residuo Ile (I) 222 por Arg (R) y el residuo Ala(A)223 por Ser, basándose en la estructura de la enzima NADPH-dependiente Adh6p de *S. cerevisiae* (las posiciones son anotadas según la secuencia en aminoácidos de Bdh1p de *Saccharomyces cerevisiae* S288C).

La o las modificación(es) de Glu (Asp) 221 y/o Ile (val) 222, y/o ala223 y cualquier combinación posible de estas 3 modificaciones entran también en el ámbito de la invención.

El primer residuo puede ser también una serina (como en el ejemplo), o cualquier aminoácido pequeño y neutro como Gly o ala.

La invención tiene también como objetivo unas cepas tales como las definidas antes genéticamente modificadas para sobreexpresar *BDH1* en un medio de fermentación alcohólica con la ayuda de un promotor fuerte de levaduras y que comprende una o varias mutaciones en *BDH1* a fin de presentar una especificidad de cofactor para el NADPH en lugar de NADH.

En un modo preferido de realización de la invención, las cepas de levadura que producen acetoína son unas cepas sobreproductoras de glicerol. Se trata en particular de cepas que contienen el gen *GPD1* o el gen *GPD2* sobreexpresado, por ejemplo obtenido por transformación de las cepas por el plásmido PVT100U-ZEO-URA3-GPD1 o por cambio *in situ* de su promotor por un promotor fuerte.

En otro modo de realización de la invención, las cepas de levadura son genéticamente modificadas a fin de reducir la producción de acetato (además de la sobreexpresión de *GPD1*). Más particularmente, se trata de cepas en las que se ha suprimido el gen *ALD6* y, llegado el caso, sus copias.

Unas cepas preferidas que 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*.

La invención tiene como objetivo también los híbridos de cepas definidas anteriormente.

La invención tiene como objetivo también un procedimiento de obtención de las cepas de levaduras antes mencionadas.

Este procedimiento aprovecha ventajosamente las técnicas de la ingeniería genética y de mutagénesis dirigida. Se mencionará a título de ejemplo la utilización de un oligonucleótido que comprende las mutaciones dianas deseadas para modificar el gen *BDH1* de una cepa de levadura, y la transformación de la cepa con un fragmento amplificado, la amplificación de una región del gen que comprende las mutaciones, o también el cruce entre cepas, partiendo de una cepa que comprende por ejemplo las mutaciones deseadas para transferirlos en otra.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de fermentación, caracterización por la adición de una cepa de levadura transformada tal como se ha definido anteriormente al medio de fermentación.

El medio de fermentación es en particular un mosto, ventajosamente un zumo de uva.

Según un aspecto de gran interés, el 2,3-butanodiol obtenido utilizando las cepas de levadura de la invención constituye un compuesto importante para una variedad de materias de base químicas y carburantes líquidos. Este compuesto puede conducir por deshidratación a la formación de metiletilcetona, utilizable como aditivo de carburante líquido.

El 2,3-butanodiol puede también ser convertido en 1,3-butanodieno, compuesto utilizado en la producción de goma sintética. Otros derivados, para unas utilidades, por ejemplo, como agentes anticongelante (forma *levo*), disolventes y plásticos, pueden también ser preparados a partir de 2,3-butanodiol. Además, se puede añadir a productos alimenticios como aroma después de la conversión en diacetilo por deshidrogenación.

La esterificación de butanodiol lleva a la formación de precursores de poliuretano para la utilización en medicamentos, productos cosméticos y lociones, etc.

La utilización de las cepas de levadura para producir 2,3-butanodiol, en particular en las aplicaciones mencionadas

anteriormente entra también en el ámbito de la invención.

En particular, la invención proporciona unos medios para obtener un rendimiento y una productividad más importante en 2,3-butanodiol de manera general, pero también para obtener unos estereoisómeros puros, en cantidades importantes en lugar de una mezcla de isómeros.

Las cepas de levadura de la invención permiten también reducir el porcentaje de diacetilo producido. Se utilizan ventajosamente para ello, en particular en las bebidas fermentadas.

Otras características y ventajas de la invención se dan en los ejemplos siguientes de modos de realización. En estos ejemplos, se hace referencia a las figuras 1 a 7 que representan, respectivamente:

- figura 1: el efecto de la sobreexpresión de *BDH1* sobre la producción de acetoína por la cepa *V5ald6 BDH1 pGPD1* para unas concentraciones en glicerol variables;

- figura 2: la producción de acetoína (a y a') y de 2,3-butanodiol (b y b') durante la fermentación para las cepas *V5* y *V5ald6 pGPD1* y *V5ald6 BDH1 pGPD1* en las condiciones (i): a, b y (ii): a', b';

- figura 3: la alineación de secuencias de *BDH1* (en negrita) y *BDH1₂₂₃*. En gris: el cambio de los 3 residuos de aminoácidos E221S/V222R/A223S que inducen una reversión de la especificidad del cofactor en *Bdh1p*;

- figura 4: la formación de acetoína en las cepas *V5ald6 BDH1 pGPD1* (negro) y *V5ald6 BDH1₂₂₃ pGPD1* (blanco) durante una fermentación;

- figura 5: la formación final de acetoína en las cepas *CEN.PKald6 pGPD1* (blanco), *CEN.PKald6 EDH1 pGPD1* (gris) y *CEN.PKald6 BDH1₂₂₃ pGPD1* (negro) al final de varias fermentaciones;

- figura 6: el funcionamiento de formas mutantes *in vivo*; y

- figura 7: la reducción de la formación de diacetilo por sobreexpresión de *BDH1*.

* Obtención de cepas *Saccharomyces cerevisiae* que sobreexpresa *BDH1*

El promotor de *BDH1* se ha sustituido por el promotor de *TDH3 in situ*, utilizando la técnica de Short Flanking Homologous (SFH) PCR (Polymerase Chain Reaction) (Guldener *et al.*, 1996).

Un fragmento constituido del módulo *kanMX*, que lleva el gen *kanR* que confiere la resistencia al antibiótico G418^R, y del promotor *TDH3* se ha amplificado por PCR a partir del plásmido bacteriano *pUG6-NOXE* (Heux *et al.*, 2005) con la ayuda de los oligonucleótidos de secuencias, respectivamente, SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2, que llevan una secuencia homóloga a *pUG6-NOXE* y una secuencia flanqueante (en cursiva) homóloga a la región diana cromosómica (promotor *BDH1*).

SEC ID nº 1: 5' *CTTTCCTCCT TACGGGGTCC TAGCCTGTTT CTCTTGATAT GCAGGTCGAC AACCCCTTAAT* 3'

SEC ID nº 2: 5' *AGTGAATATC ACCCTTCTTG AAATATGCCA AAGCTCTCAT TCGAAACTAA GTTCTTGGTGT* 3'

Condiciones experimentales utilizadas para la PCR:

Oligonucleótido SEC ID nº 1	5 µl (20 pmoles)
Oligonucleótido SEC ID nº 2	5 µl (20 pmoles)
DyNazyme EXT Buffer 10X + 15 mM MgCl ₂ (FINNZYMES, Finlandia)	5 µl
dNTP 2 mM	5 µl
pUG6-NOXE	1 µl (25 ng)
H ₂ O	28,25 µl
DyNazyme EXT (FINNZYMES, Finlandia)	0,75 µl

30 ciclos (45 s a 94°C, 30 s a 55°C, 2 min. a 72°C) sobre un amplificador Perkin-Elmer Cetus modelo 9600.

El producto de PCR obtenido se ha precipitado con etanol en presencia de sales. Se han utilizado 3 µg del ADN precipitado para transformar las cepas de levadura *S. cerevisiae* *V5* y *V5ald6*. La cepa *V5* (*MATa, ura3*) deriva de una cepa enológica. La cepa *V5* y la cepa *V5ald6* (Remize *et al.*, 1999) en la que las dos copias del gen *ALD6* se han suprimido y se han transformado mediante el método de acetato de litio (Schiestl y Gietz, 1989). Los transformantes se han seleccionado en cajas YPD G418^R. Se ha verificado por PCR la integración del promotor

TDH3 en lugar del promotor *BDH1*.

Resultados

5 Los resultados obtenidos muestran que la cepa V5 *BDH1* tiene el mismo crecimiento y velocidad de fermentación que la cepa control V5. La medición de la actividad BDH durante la fase exponencial y la fase estacionaria muestra que la actividad enzimática BDH de la cepa que sobreexpresa *BDH1* es superior en aproximadamente 30 veces la de la cepa salvaje (actividad específica media V5: 0,1 U/mg de proteína total; actividad específica media V5 *BDH1* : 3,2 U/mg de proteína total).

10 * Efecto de la sobreexpresión de *BDH1* en cepas que sobreexpresan *GPD1*

Las cepas V5, V5ald6, V5 *BDH1* y V5ald6 *BDH1* se han transformado por 10 ng del vector multicopia PVT100U-ZEO-*GPD1* (Remize *et al.*, 1999) que lleva el gen *URA3*. Los transformantes se han seleccionado sobre cajas YNB suplementadas en metionina (115 mg/l). Después de la verificación por PCR, se han obtenido cuatro cepas: V5 *pGPD1*, V5ald6 *pGPD1*, V5 *BDH1 pGPD1* y V5ald6 *BDH1 pGPD1*.

* Efecto de la sobreproducción de Bdh1p sobre la síntesis de acetoína

20 *Condición de cultivo* – Las cepas estudiadas durante la fermentación en condiciones enológicas son indicadas en la tabla 1 siguiente.

Cepa	Características
V5	Cepa <i>S. cerevisiae</i> derivada de una levadura enológica MATa, <i>ura3</i>
V5 <i>BDH1</i>	Cepa V5 que sobreexpresa <i>BDH1</i>
V5 <i>pGPD1</i>	Cepa V5 que sobreexpresa <i>GPD1</i>
V5 <i>BDH1 pGPD1</i>	Cepa V5 que sobreexpresa <i>BDH1</i> y <i>GPD1</i>
V5ald6 <i>pGPD1</i>	Cepa V5 suprimida para <i>ALD6</i> y que sobreexpresa <i>GPD1</i>
V5ald6 <i>BDH1 pGPD1</i>	Cepa V5 suprimida para <i>ALD6</i> , que sobreexpresa <i>GPD1</i> y <i>BDH1</i>

25 Las fermentaciones se han realizado en reactores de 1,2 litros (SGI, Francia) con un volumen de reacción de 1 litro. El medio MS se ha utilizado para el precultivo y el cultivo. Se trata de un medio sintético que simula un mosto estándar de uva (Bely *et al.*, 1990). El medio MS contiene un 20% de glucosa, 6 g/l de ácido málico, 6 g/l de ácido cítrico, 460 mg/l de nitrógeno, en forma de NH_4Cl (120 mg/l) y de aminoácidos (340 mg/l). El medio está suplementado con metionina (115 mg/l) y, si es necesario, uracilo (50 mg/l). El pH del medio MS es de 3,3. Unos factores de anaerobiosis, ergosterol (7,5 mg/l), ácido oleico (2,5 mg/l) y Tween 80 (0,21 g/l) son añadidos. Los precultivos se han realizado en matraces de Erlenmeyers de 100 ml que contienen 20 ml de medio a 28°C bajo agitación (150 rpm) durante 30h. Los reactores se han inoculado a partir de estos precultivos, a una densidad celular de 1.10^6 células/ml, y mantenidos a temperatura constante de 28°C con agitación permanente (300 rpm).

35 Las muestras de cultivo se han recogido con la ayuda de una jeringa. Los datos de fermentación están expresados en función del tiempo.

Métodos analíticos – El crecimiento se siguió mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm y por el recuento del número de células en un aparato de tipo Coulter Counter (ZBI) a partir de una fracción alícuota de medio de cultivo.

40 Los metabolitos se han dosificado en el sobrenadante, después de la centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos de las muestras realizadas. Las concentraciones en glucosa, glicerol, etanol, piruvato, succinato, acetato, α -cetoglutarato y 2-hidroxiglutarato se han determinado mediante cromatografía líquida bajo alta presión (HPLC) utilizando una columna de tipo HPX-87H (Bio-Rad). La concentración en acetaldehído se ha determinado mediante el método enzimático descrito por Lundquist (1974). Las concentraciones en acetoína y en 2,3-butanodiol se han determinado por cromatografía en fase gaseosa, como se describe por Michninc *et al.*, 1997.

50 La figura 1 muestra el impacto de la sobreexpresión de *BDH1* sobre la producción de acetoína. En este ejemplo, la producción de este compuesto se ha analizado durante la fermentación por V5ald6 *pGPD1* y V5ald6 *BDH1 pGPD1*. Se han utilizado dos condiciones diferentes de sobreproducción de glicerol. En las condiciones (i) no se ha utilizado ninguna presión de selección para mantener el plásmido pVT100U-ZEO-*GPD1*, que resulta en una sobreproducción moderada de glicerol, que alcanza 10-15 g/l. En las condiciones (ii), se han cultivado las cepas V5 *BDH1 pGPD1* y V5ald6 *BDH1 pGPD1* en ausencia de uracilo, lo que permite el mantenimiento del plásmido durante toda la fermentación, generando una sobreproducción muy elevada de glicerol, 20-30 g/l.

55 En las dos condiciones ensayadas (i) y (ii), la sobreproducción de *BDH1* permite una disminución drástica de la

producción de acetoina hasta un 90% con respecto al nivel producido por la cepa control *V5ald6 pGPD1*, y un aumento correspondiente de la producción de 2,3-butanodiol (figura 2). Se ha utilizado la cepa V5 como control. Esta cepa no acumula acetoina y produce aproximadamente 0,5 g/l de 2,3-butanodiol.

- 5 La figura 2 muestra los niveles de acetoina obtenidos después de varios experimentos de fermentación con las cepas *V5ald6 pGPD1* y *V5ald6 BDH1 pGPD1*, en las mismas condiciones que antes.

Mutagénesis dirigida *in vitro* de *BDH1*

- 10 Partiendo de la secuencia proteica codificada por el gen *BDH1* de la cepa S288C [Saccharomyces genome database <http://www.yeastgenome.org/>], se han introducido unas mutaciones que corresponden al cambio de un aminoácido en cada etapa de PCR. Gracias a los oligonucleótidos que comprenden las mutaciones deseadas y un plásmido que contiene el *BDH1* nativo de S288C (*pYES2-BDH1*), se han construido las enzimas mutadas siguientes:

Enzima salvaje:	<i>BDH1</i> de S288C	221 EIAERR 226
Simple mutante:	E221S	221 SIAERR 226
Doble mutante:	E221S/I222R	221 SRAERR 226
Triple mutante:	E221S/I222R/A223S	221 SRSERR 226

- 15 - Mutagénesis dirigida

- 20 Las mutaciones se han introducido utilizando un método basado en el Quickchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA). Se ha construido el mutante E221S a partir de la región que codifica *BDH1* de la cepa de laboratorio S288C clonada en el plásmido *pYES2* (Invitrogen, Carlsbad, CA): *pYES2-BDH1* (Gonzalez E, 2000). Este vector lanzadera contiene un promotor inducible (promotor y secuencia UAS de *GAL1*), el origen de la replicación 2 μ , el marcador de selección *URA3* y los elementos bacterianos (origen de replicación y gen de resistencia a la ampicilina).

- 25 Se ha utilizado el plásmido *pYES2-BDH1* que contiene las mutaciones E221S, E221S/I222R y E221S/I222R/A223S como matriz para obtener el simple, el doble y el triple mutante, respectivamente.

- 30 La mutagénesis se ha efectuado por PCR utilizando unos oligonucleótidos que contiene las mutaciones (en negrita) y en el sentido directo y en el sentido inverso (E221S: MUT 221-1 (SEC ID N°3), MUT 221-2 (SEC ID N° 4); E221S/I222R: MUT 222-1 (SEC ID N°5), MUT 222-2 (SEC ID N°6); E221S/I222R/A223S: MUT 223-1 (SEC ID N° 7), MUT 223-2 (SEC ID N°8)).

- 35 SEC ID N°3 (MUT223221-1)
5'GGGCTAGTAAAATTGTAGTGTCTT**CA**ATTGCAGAGAGAAGAATAGAAATGG 3',
SEC ID N°4 (MUT223221-2)
5'CCATTTCTATTCTTCTCTCTGCAATT**GA**AGACACTACAATTTTACTAGCCCC 3'
SEC ID N°5 (MUT224222-1)
5' GGGGCTAGTAAAATTGTAGTGTCTT**CAAGAG**CAGAGAGAAGAATAGAAATGG 3'
SEC ID N°6 (MUT224222-2)
40 5' CCATTTCTATTCTTCTCTCTGCT**TCTTGA**AGACACTACAATTTTACTAGCCCC 3'
SEC ID N°7 (MUT225223-1)
5' GGGGCTAGTAAAATTGTAGTGTCTT**CAAGATCA**GAGAGAGAAGAATAGAAATGG 3'
SEC ID N°8 (MUT225223-2)
5' CCATTTCTATTCTTCTCTCT**GATCTTGA**AGACACTACAATTTTACTAGCCCC 3'

- 45 Unas células de *Escherichia coli* (XL-10 Gold® ultracompetentes, Stratagène, La Jolla, CA) se han transformado sucesivamente por los plásmidos construidos. Los transformantes se han cultivado a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina y el ADN plasmídico de estos clones se ha extraído mediante el kit Genelute Plasmid Miniprep® (Sigma, USA) y analizado por secuenciación.

- 50 - Transformación

- 55 Se ha transformado la cepa de laboratorio FY834 *bdh1 Δ* (*MAT α his3 Δ 200 ura3-52 leu2 Δ 1 lys2 Δ trp1 Δ*) por *pYES2-BDH1*, *pYES2-MUT 221*, *pYES2-MUT 222*, *pYES2-MUT 223*. El método de transformación utilizado es el del acetato de litio descrito por Schiestl y Gietz (1989). El medio selectivo utilizado para seleccionar las cepas transformadas por los plásmidos es el YNB (0,67% Yeast nitrogen base, 2% glucosa) suplementado en histidina, leucina, lisina y triptófano. La ausencia de uracilo permite conservar una presión de selección para los plásmidos.

- 60 - Condiciones de cultivo

Se han inoculado 20 ml de medio YNB (20% galactosa) mediante 5 transformantes, respectivamente. Se ha realizado el cultivo a 28°C durante 2 días.

- Determinación de la actividad enzimática

Se ha determinado la actividad butanodiol deshidrogenasa a partir de los extractos proteicos brutos a 25°C midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm. Una unidad de actividad corresponde a 1 µmol de cofactor utilizado por minuto, basado en un coeficiente de absorción de 6220 cm⁻¹ M⁻¹ a 340 nm para NADH y NADPH. Las trayectorias ópticas para las reacciones de reducción eran de 1 cm, 0,5 cm y 0,2 cm. Las determinaciones de la actividad enzimática se realizaron en presencia de 50 mM de acetoina en 33 mM de NaH₂PO₄, pH 7,0/NaOH. Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante determinaciones de la actividad con unas concentraciones en coenzima de 1/3xK_m a 10xK_m de BDH para NADH (0,055 mM).

La actividad BDH se ha determinado en unos extractos brutos de la cepa que expresa la forma salvaje (pYES2-BDH1) y unas cepas que expresan las formas mutadas. Se han determinado también los parámetros cinéticos de las diferentes formas (tabla 2).

Los tres mutantes presentan una afinidad para el NADPH muy fuertemente reducida, en un 90% de media con respecto a la de la enzima nativa.

Tabla 2

NADH	AS (µmol/min.mg)	K _{ma} (mM)
BDH	4,9 ± 0,8	0,04 ± 0,00
BDH221	0,5 ± 0,1	ND
BDH222	0,7 ± 0,2	ND
BDH223	0,3 ± 0,2	ND
NADPH	AS (µmol/min.mg)	K _{ma} (mM)
BDH	No detectado	-
BDH221	1,0 ± 0,1	0,12 ± 0,02
BDH222	4,6 ± 0,1	0,24 ± 0,14
BDH223	5,6 ± 0,7	0,15 ± 0,01

Se observa una reversión importante de la especificidad de cofactor de NADH a NADPH para todos los mutantes (tabla 2). En efecto, los mutantes presentan todos una actividad NADPH-dependiente. La constante de afinidad aparente (K_{ma}) para el NADPH es del mismo orden para los tres mutantes.

El conjunto de los datos muestra que las mutaciones realizadas disminuyen muy fuertemente la actividad NADH-dependiente de la enzima e introducen una afinidad para el NADPH. Los tres mutantes presentan una afinidad próxima para el NADPH. Por el contrario, las formas doble y triple mutantes son particularmente interesantes debido a su mejor actividad específica comparativamente al simple mutante.

Con el fin de evaluar el impacto del cambio de cofactor de la BDH en la cepa modelo enológica V5ald6, se ha sobreexpresado el gen BDH1 que lleva la triple mutación, denominado BDH1₂₂₃, en esta cepa por mutagénesis dirigida *in situ*. Se han sintetizado dos oligonucleótidos, incluyendo uno de 55 pares de bases (SEC ID N° 9) que contiene las mutaciones dianas, y se han utilizado para amplificar la región loxpKanMXloxp-TDH3p-BDH1 de una cepa V5ald6 BDH1. El fragmento amplificado, que contiene el marcador KanMX y, bajo el control del promotor TDH3, el gen BDH1 hasta la región que contiene las 3 mutaciones, se ha utilizado para transformar una cepa V5ald6.

Esta estrategia ha permitido en una etapa integrar por recombinación homóloga las mutaciones dianas en la secuencia genómica de Bdh1p sobreexpresando al mismo tiempo el gen mutado.

SEC ID N° 1

5' CTTTCCTCCT TACGGGGTCC TAGCCTGTTT CTCTTGATAT GCAGGTCGAC
AACCTTAAT

SEC ID N° 9

5'GGCCATTCTATTCTCTCTCTGATCTTGAAGACACTACAATTTACTGGCCCC

Condiciones experimentales utilizadas para la PCR:

Oligonucleótido (1)	5 µl (20 pmoles)
Oligonucleótido (2)	5 µl (20 pmoles)
Taq Buffer 10X + 15 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP 2,5 mM	4 µl
ADN total <i>V5ald6 BDH1</i>	2 µl (50 ng/µl)
H ₂ O	28,25 µl
Taq	0,75 µl

30 ciclos (10 ciclos: 20 s 94°C, 20 s 60°C, 3 min 72°C; 20 ciclos: 15 s 94°C, 30 s 60°C, 2 min + 20s/ ciclo 72°C).

5 El producto de PCR obtenido se ha precipitado con etanol en presencia de sales. Se han utilizado 4 µg del ADN precipitado para transformar las cepas de levadura *S. cerevisiae V5ald6*.

10 La integración se ha verificado por digestión enzimática del producto de PCR durante 2 horas a 37°C por la enzima Bbs I utilizando la mezcla de reacción siguiente: 13,5 µl de producto de PCR; 1,5 µl de tampón NEB2 10X (Biolabs, USA); 0,25 µl (1,25 U) de Bbs I (Biolabs, USA).

15 Después, se ha determinado la actividad enzimática sobre el extracto bruto proteico de una cepa que ha integrado las mutaciones deseadas. Para cada determinación, se han utilizado 20 µl de extracto bruto en presencia de 0,2 mM de NADH/NADPH y 50 mM de acetoína.

20 En paralelo, se ha secuenciado la región modificada, lo que ha permitido verificar que la secuencia de BDH1 mutada es idéntica a la del gen nativo, con la excepción de las mutaciones introducidas, que conducen un cambio de 3 aminoácidos en la proteína (Figura 3).

Impacto fisiológico del cambio de especificidad del cofactor de Bdh1

25 La cepa *V5ald6 BDH1 pGPD1*, que sobreexpresa la Bdh1 salvaje, se ha comparado con el clon que tiene la Bdh1 NADPH-dependiente (*V5ald6 BDH1₂₂₃ pGPD1*) en fermentación enológica sobre mosto sintético a 200 g/l de glucosa. Se han estudiado estas 2 cepas en fermentación en ausencia de uracilo (presión de selección).

30 En estas condiciones, los perfiles de velocidad de fermentación y de biomasa son idénticos. No se observa ningún efecto significativo sobre los subproductos de fermentación salvo un aumento de la formación en α-cetoglutarato (de 480 mg/l a 620 mg/l), en OH-glutarato (de 1400 mg/l a 1620 mg/l) y en glicerol (de 30,2 g/l a 32,2 g/l) en la cepa que sobreexpresa la Bdh mutada con respecto a la Bdh nativa. El aumento de la formación en glicerol puede explicarse por una mayor disponibilidad en NADH, debido a la utilización preferencial de NADPH por Bdh1₂₂₃. La acumulación de alfa-cetoglutarato se puede relacionar con la limitación de su reducción en glutamato, reacción catalizada por el glutamato deshidrogenasa Gdhlp NADPH dependiente. Por el contrario, la producción de OH-glutarato, otro producto reducido de alfa-cetoglutarato, podría resultar de la mayor disponibilidad en NADH. Estas observaciones muestran claramente un efecto *in vivo* del cambio de cofactor de *BDH1* de NADH en NADPH.

35 El efecto más destacado obtenido por el cambio de especificidad de cofactor es una reducción muy significativa de la producción de acetoína en la cepa *V5ald6 BDH1₂₂₃ pGPD1* con respecto a la cantidad producida por *V5ald6 BDH1 pGPD1*. En las condiciones ensayadas, esta reducción es de aproximadamente 400 mg/l (Fig. 4).

40 Los inventores han mostrado, por otro lado, que este efecto se obtenía también en otro fondo genético, la cepa *S. cerevisiae* de laboratorio CEN.PK. En efecto, la sobreexpresión de *BDH1₂₂₃* en CEN.PK *ald6 pGPD1*, que produce 1638 mg/l de acetoína sobre mosto sintético que contiene 50 g/l de glucosa, conduce a una reducción del 68% de la producción de acetoína, mientras que la sobreexpresión de la enzima nativa reduce sólo el 18% esta producción. La cantidad en 2,3-butanodiol aumenta de manera estequiométrica con la disminución de acetoína (Figura 5).

45 Esto muestra claramente un efecto fisiológico relacionado al cambio de especificidad de cofactor de Bdh1 a fuertes concentraciones en glicerol. No sólo la cantidad de enzima Bdh1 sino también la disponibilidad en NADH es limitante en unas cepas sobreproductoras de glicerol.

50 La invención proporciona así unas cepas de levaduras salvajes y mutadas, que sobreproducen la 2,3-butanodiol deshidrogenasa, incluso unas cepas sobreproductoras de glicerol con producción de acetato controlada, acumulando 2,3-butanodiol en cantidad importante y con una producción considerablemente reducida de acetoína.

55 Como lo muestran los ejemplos anteriores, la sobreexpresión de *BDH1* a través de una sustitución *in situ* de su promotor por el de *TDH3* resulta muy eficaz, ya que se ha obtenido un aumento de la actividad de un factor 30. El

análisis de estas cepas durante la fermentación enológica muestra por otro lado que el nivel de expresión de *BDH1* y de actividad enzimática de BDH es, por supuesto un factor limitante en la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol en unas cepas que sobreproducen glicerol.

5 Estos resultados muestran que la conversión de acetoína en 2,3-butanodiol está también limitada por la disponibilidad en NADH. En efecto, la sobreexpresión de una forma mutada de la BDH NADPH-dependiente genera una disminución suplementaria en acetoína con respecto a una cepa que sobreexpresa la enzima salvaje.

10 Así, la estrategia seguida según la invención de sobreexpresión de *BDH1* y de cambio de especificidad de cofactor de la BDH de NADH en NADPH permite una conversión extremadamente eficaz de la acetoína en 2,3-butanodiol.

15 La estrategia de sobreexpresión de *BDH1*₂₂₃ puede ser considerada para reducir la acetoína en cualquier cepa modificada o no modificada que acumula este compuesto, como las cepas sobreproductoras de glicerol. Otro ejemplo es una cepa que sobreexpresa una NADH oxidasa bacteriana. En efecto, se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *NOXE* que codifica la NADH oxidasa de *Lactococcus lactis* en la cepa V5 disminuye el contenido intracelular en NADH, lo que conlleva una bajada del rendimiento de etanol del hecho de la limitación de la actividad alcohol deshidrogenasa. En esta cepa, los carbonos no dirigidos hacia la formación de etanol se acumulan a nivel del nudo acetaldehído, en particular la acetoína (Heux *et al.*, 2006). La expresión de una forma mutada de la BDH que utiliza NADPH como cofactor, favoreciendo la conversión de la acetoína en 2,3-butanodiol, podría disminuir la producción de este compuesto.

20 Los otros mutantes descritos antes, que presentan una afinidad incrementada frente a NADPH, en particular el doble mutante que tiene las mismas características que el triple mutante, pueden también ser interesantes para reducir la acetoína en condiciones fisiológicas.

25 La expresión de una Bdh1p NADPH-dependiente en la levadura permite modificar el equilibrio de los cofactores NADP/NADPH y, para ello, puede constituir una herramienta interesante en el estudio del equilibrio de oxidorreducción intracelular.

30 *BDH1* en levadura: homologías de secuencia inter- e intra-especie.

35 El cambio de especificidad de la BDH se ha llevado a cabo en las cepas S288C y V5 mientras que el sitio de unión el cofactor difiere de un aminoácido entre estas 2 cepas. La cepa V5 tiene en efecto una valina en la posición 222 mientras que S288C tiene una isoleucina en la misma posición. En cada una de sus cepas, la introducción de las mutaciones E221S, E221S/I(V)222R y E221S/I222R/A223S resulta eficaz y ha permitido obtener un cambio completo de especificidad de cofactor de NADH en NADPH.

40 La conservación de este sitio se ha analizado en otras cepas de *Saccharomyces cerevisiae* cuyo genoma se ha secuenciado <http://www.sanger.ac.uk/gbrowse/gbrowse/Saccharomyces/>.

45 El estudio muestra que las 12 cepas analizadas se dividen en 2 grupos, uno (DBVPG1373, DBVPG1853, DBVPG6765, L_1374, L_1528 y SK1) caracterizado por la secuencia 221 EVA 223 (secuencia de tipo V5), el otro (DBVPG6044, S288C, Y55, YGPM, YPS128 y YPS606) por la secuencia 221 EIA 223 (secuencia de tipo S288C). Estas observaciones indican que los efectos de la mutagénesis dirigida anteriormente pueden extenderse a las otras cepas de *S. cerevisiae*.

50 De la misma manera, se han buscado las homologías de secuencia de Bdh1p (S288C) con otras especies de levadura (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/path/>). Se han encontrado 5 genes ortólogos de *BDH1* en *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis* y *Debaryomyces hansenii*. La alineación de las secuencias proteicas muestra una conservación muy fuerte del sitio de unión al NADH, siendo los aminoácidos 221 y 223 idénticos a los de *S. cerevisiae*. La posición del aminoácido 222 es más variable, como se observa entre las cepas *S. cerevisiae*. En el caso de las levaduras no *Saccharomyces*, este aminoácido es una prolina, de la misma familia (aminoácidos alifáticos hidrófobos) que la isoleucina o la valina.

55 Debido a esta similitud de secuencia, los cambios de aminoácidos por mutagénesis dirigida descritos anteriormente y sus efectos pueden aplicarse perfectamente a otras especies de levaduras que *S. cerevisiae*.

• Otro ejemplo de caracterización de las propiedades enzimáticas de las formas mutadas de Bdh1p.

60 • *Transformación*

65 La cepa de laboratorio WV36-405 (Mata, *ade2*, *ura3-52*, *trp1*, *adh1* Δ, *adh2* Δ, *adh3* Δ, *adh4*::TRP1) (Atrian *et al.*, 1990) se ha transformado también por pYes2, pYes2-BDH1, pYes2-MUT 221, pYes2-MUT 222, pYES2-MUT 223 mediante el método de transformación con acetato de litio descrito (Schiestl & Gietz, 1989). El medio selectivo utilizado para selección las cepas transformadas es YNB (0,67% Yeast nitrogen base, 2% glucosa) suplementado en adenina.

- **Condiciones de cultivo y preparación de los extractos brutos**
20 ml de medio YNB (2% galactosa) se inocularon mediante los transformantes. Se han extraído las células en fase de crecimiento, a DO (600 nm) 2,5. Las células (10^9) se han suspendido en 500 μ l de tampón A (20 mM de sodio fosfato (pH 7,0) que contiene un 1% de glicerol y 0,5 mM de DTT) y trituradas con la ayuda de bolas de vidrio. Después de la centrifugación a 12 000 rpm durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se utilizó para las determinaciones enzimáticas.
- **Determinación de actividad enzimática**
La actividad 2,3-butanodiol deshidrogenasa se ha determinado a partir de los extractos brutos midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm como se describe a continuación. Las determinaciones se han realizado en presencia de 33 mM de fosfato de sodio (pH 7,0), 0,5 mg/l de BSA (albúmina de suero bovino), de acetoína y de 1 mM NAD (P) H. La concentración en proteínas en los extractos se determinó con el método de Bradford (Bio-Rad). Los K_m y V_m para el NAD(P)H (tabla 3) se han determinado en presencia de 50 mM y 450 mM de acetoína para Bdh1 y los mutantes Bdh1 respectivamente.

Tabla 3

NADH			
Enzima	K_m (μ M)	V_m (U/mg)	V_m/K_m (ml mg^{-1} min^{-1})
Bdh1	45 \pm 4	94 \pm 1,7	2090 \pm 194,0
Bdh1 ₂₂₁	700 \pm 20	9 \pm 0,1	12 \pm 0,3
Bdh1 ₂₂₂	n.s	n.s	n.d
Bdh1 ₂₂₃	n.s	n.s	n.d

NADPH

Enzima	K_m (μ M)	V_m (U/mg)	V_m/K_m (ml mg^{-1} min^{-1})
Bdh1			n.d
Bdh1 ₂₂₁	87 \pm 6	15 \pm 0,2	178 \pm 12
Bdh1 ₂₂₂	44 \pm 4	59 \pm 1,0	1347 \pm 130
Bdh1 ₂₂₃	44 \pm 10	105 \pm 1,5	2392 \pm 157

n.s: ninguna saturación con hasta 1 mM NADH.

n.d: no determinado

Las actividades específicas con NADH y NADPH se dan en la tabla 4.

Tabla 4

Enzima	Actividad específica (U/mg)	
	NADH (1mM)	NADPH (1mM)
Bdh1	92,0 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0
Bdh1 ₂₂₁	4,1 \pm 1,4	13,7 \pm 0,5
Bdh1 _{221,222}	4,8 \pm 1,7	54,7 \pm 1,9
Bdh1 _{221,222,223}	6,1 \pm 0,1	93,2 \pm 3,5

Los mutantes presentan todos una actividad NADPH-dependiente (Tablas 3 y 4). La afinidad para el NADPH de las formas doble y triple mutantes (44 μ M) es idéntica a la de Bdh1 para el NADH (45 μ M). La comparación de las actividades específicas de cada enzima en presencia de 1 mM NAD (P) H (tabla 3) muestra que la forma triple mutante tiene una actividad sustancialmente más elevada para el NADPH que el doble mutante.

Funcionamiento de las formas mutantes *in vivo*

Con el fin de evaluar el funcionamiento *in vivo* de las formas Bdh1 mutantes NADP-dependientes, se ha transformado la cepa de laboratorio ENYpgi1 (MATa, *ura3-52*, *leu2-3*, *trp1-289*, *his- Δ 1*, *MAL2-8c*, *MAL3*, *SUC3*, *pgi1::KanMX*) (Heux *et al.*, 2008) por pYes2, pYes2-BDH1, pYes2-MUT 221, pYes2-MUT 222, pYES2-MUT 223. Los transformantes se han seleccionado en un medio mínimo sin uracilo que contiene un 2% de fructosa y un 0,05% de glucosa.

Se han realizado unos ensayos de caída a partir de células extraídas en fase exponencial de crecimiento a DO₆₀₀ 1. Las células se han diluido de 10 en 10, y se han depositado 10 μ l de cada dilución en medios agar YEP (Yeast

extract 1%, Peptona 2%) 2% fructosa plus 0,05% galactosa; YEP 0,5% galactosa o YEP 0,5% galactosa plus 0,05, 0,1 o 0,2% acetoína.

5 La cepa ENY*pgi1* se suprime para *PGI1* que codifica la fosfoglucoasa isomerasa. Esta enzima está situada en la unión de la glicólisis y de la vía de las pentosa fosfata (VPP). En este mutante, la glucosa 6-fosfata está totalmente redirigida hacia la VPP, lo que genera un exceso de NADPH que impide a la cepa desarrollarse. Por el contrario, este mutante puede desarrollarse si se le proporciona un sistema de reoxidación del NADPH, por ejemplo proporcionado por una expresión de la transhidrogenasa *udha* de *E. coli*.

10 En efecto, la figura 6 muestra que ENY*pgi1* no puede crecer en galactosa como única fuente de carbono, mientras que la expresión de *udha* permite restaurar su crecimiento. Si se añade acetoína al medio de cultivo (figura 6c), el crecimiento de ENY*pgi1* que expresa las formas mutadas de *Bdh1* está también restaurada. Destaca de estos resultados que las formas *BDH* NADPH-dependientes son capaces de reoxidar el NADPH producido en exceso por esta cepa en NADP, lo que demuestra su funcionalidad *in vivo*.

15 • sobreexpresión de *BDH1* para reducir la formación de diacetilo

20 El diacetilo (2,3-butanodiona) es indeseable en las bebidas fermentadas. En el vino, su umbral de detección varía entre 0,2 y 2,8 mg/l, y se considera como indeseable más allá de 5 mg/l. en la cerveza, el diacetilo plantea un problema mayor debido a su umbral de detección muy bajo (0,1 ppm) y es necesaria una larga etapa de maduración para eliminar este compuesto.

25 El diacetilo proviene de la descarboxilación oxidativa del α -acetolactato, un agente intermedio de la biosíntesis de la isoleucina, leucina, valina, y puede ser reducido en acetoína. Se ha demostrado que *Bdh1* tiene, *in vitro*, una actividad de reducción del diacetilo. A fin de estudiar el impacto de *Bdh1* sobre el diacetilo *in vivo*, se ha efectuado una determinación de la concentración final en diacetilo producido por las cepas V5ald6*pGPD1* y V5ald6*BDH1pGPD1* en el experimento descrito en la figura 2a.

30 La concentración en diacetilo se ha determinado por SPME (solid-phase microextraction) utilizando diacetilo-d6 deuterado como patrón interno, y GC-MS (Hayasaka & Bartowsky, 1999). La sobreexpresión de *BDH1* permite reducir la producción de diacetilo por un factor 2 (figura 7). Se han obtenido unos resultados similares con una cepa que sobreexpresa la forma triple mutada de *Bdhl*.

35 Referencias bibliográficas

Gonzalez, E, Fernandez, M R, Larroy, C, Sola, L, Pericas, M A, Pares, X, y Biosca, J A. 2000. Characterisation of a (2R,3R)-2,3-Butanodiol Dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W Gene Product. *J. Biol. Chem.* 275: 35876-35885.

40 Remize, F, Roustan, J L, Sablayrolles, J M, Barre, P, y Dequin, S. 1999. Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 143-149.

45 Güldener, U, Heck, S, Fiedler, T, Beinhauer, J y Hegemann J.H. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Ac. Res.* 24: 2519-2524 Schiestl, R. H. and R.D. Gietz. 1989. High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acid as carrier. *Curr. Genet.* 16:339-446.

50 Bely, M., Sablayrolles J.M. y P. Barre. 1990. Automatic détection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.* 70:246-252.

55 Michnick S, Roustan JL, Remize F, Barre P, Dequin S, 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* 13: 783-793.

Heux, S, Cachon, R, Dequin, S. 2005. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on metabolic flux redistribution. *Metab. Eng.*

60 Heux S., Sablayrolles JM, Cachon R. y Dequin S (2006) Engineering *S. cerevisiae* wine yeast with reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5822-5828

65 Lundquist, F. (1974). Acetaldehyd: Bestimmung Mit Aldehyd-dehydrogenase., *Methods of Enzymatic Analysis.*, Academic Press, Inc., p. 1509-1513.

Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339-346.

5 Heux, S., Cadere, A. & Dequin, S. (2008). Glucose utilization of strains lacking PGI1 and expressing a transhydrogenase suggests differences in the pentose phosphate capacity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 217-24. Hayasaka et Bartowsky (1999). Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 47, 612-617.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LALLEMAND SAS INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)

15 <120> MEDIOS PARA REDUCIR LA ACUMULACIÓN DE ACETOÍNA EN MEDIOS DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

<130> CP/SF 62209-3069

20 <150> FR 07/03279
<151> 2007-05-07

<160> 9

25 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 60
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido

35 <400> 1
ctttctctct tacggggtcc tagcctgttt ctcttgatat gcaggtcgac aacccttaat 60

40 <210> 2
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido

45 <400> 2
agtgaatatc acccttcttg aaatatgcca aagctctcat tcgaaactaa gttcttggtg 60

t 61

50 <210> 3
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido

55 <400> 3
ggctagtaa aattgtagtg tctcaattg cagagagaag aatagaaatg g 51

60 <210> 4
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 559 064 T3

<223> oligonucleótido
 <400> 4
 5 ccatttctat tcttctctct gcaattgaag aactacaat ttactagcc cc 52
 <210> 5
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 5
 15 ggggctagta aaattgtagt gtcttcaaga gcagagagaa gaatagaaat gg 52
 <210> 6
 <211> 52
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 6
 ccatttctat tcttctctct gctcttgaag aactacaat ttactagcc cc 52
 <210> 7
 <211> 52
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 7
 ggggctagta aaattgtagt gtcttcaaga tcagagagaa gaatagaaat gg 52
 <210> 8
 <211> 52
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 45 <400> 8
 ccatttctat tcttctctct gatcttgaag aactacaat ttactagcc cc 52
 <210> 9
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 9
 60 ggccatttct attcttctct ctgatcttga agacactaca atttactgg ccccc 55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepas de levaduras en las que el gen BDH1 que codifica para la proteína Bdh1p que tiene una actividad butanodiol deshidrogenasa, está sobreexpresado con respecto a la cepa inicial, caracterizadas por que:
- dichas levaduras comprenden una o varias mutaciones en el gen BDH1 a fin de presentar una especificidad de cofactor para el NADPH en lugar de NADH, y catalizan la reducción de la acetoína en 2,3-butanodiol según un porcentaje al menos 2 veces superior al de la cepa inicial; y
 - 10 - por que la proteína Bdh1p codificada por el gen BDH1 comprende una mutación en la posición 221, 222 o 223, o en las posiciones 221 y 222, o 221 y 223, o 222 y 223, o 221, 222 y 223 con referencia a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* S288C, siendo la mutación en la posición 221, S, en la posición 222, R, y en la posición 223, S.
- 15 2. Cepas de levaduras según la reivindicación 1, caracterizadas por que se trata de cepas genéticamente transformadas para sobreexpresar BDH1 con la ayuda de un promotor fuerte de levaduras.
3. Cepas de levaduras según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizadas por que el gen BDH1 comprende una o varias mutaciones a fin de codificar para una proteína Bdh1p en la que uno o varios aminoácidos están mutados.
- 20 4. Cepas de levaduras según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas por que comprenden un gen GPD1 o un gen GPD2 sobreexpresado.
5. Cepas de levaduras según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizadas por que el gen ALD6 se ha suprimido y, llegado el caso, sus copias.
- 25 6. Cepas de levaduras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizadas por que pertenecen al género *Saccharomyces*.
- 30 7. Cepas de levaduras según la reivindicación 6, caracterizadas por que se trata de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces kudriavzevii*.
8. Cepas de levaduras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizadas por que pertenecen al género no *Saccharomyces*.
- 35 9. Cepas de levaduras según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizadas por que se trata de híbridos.
10. Método de reducción del porcentaje de acetoína en una cepa de levadura, caracterizado por que comprende la utilización de una cepa de levadura según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 11. Procedimiento de fermentación de zumo de fruta, caracterizado por que comprende la adición en un medio de fermentación de cepas de levadura tales como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que el zumo de fruta es un zumo de uva.
13. Utilización de las cepas de levaduras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para producir 2,3-butanodiol.
- 50 14. Utilización de las cepas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para reducir la producción de diacetilo, en particular en la industria cervecera.

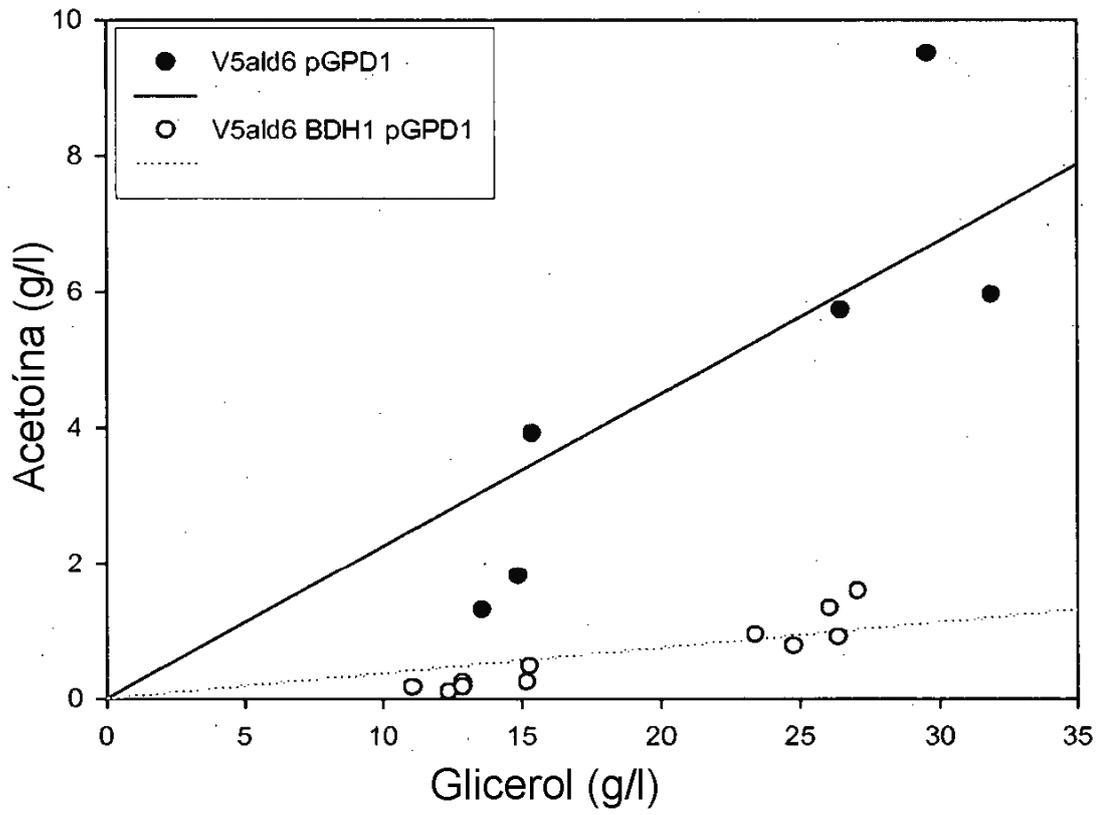


FIGURA 1

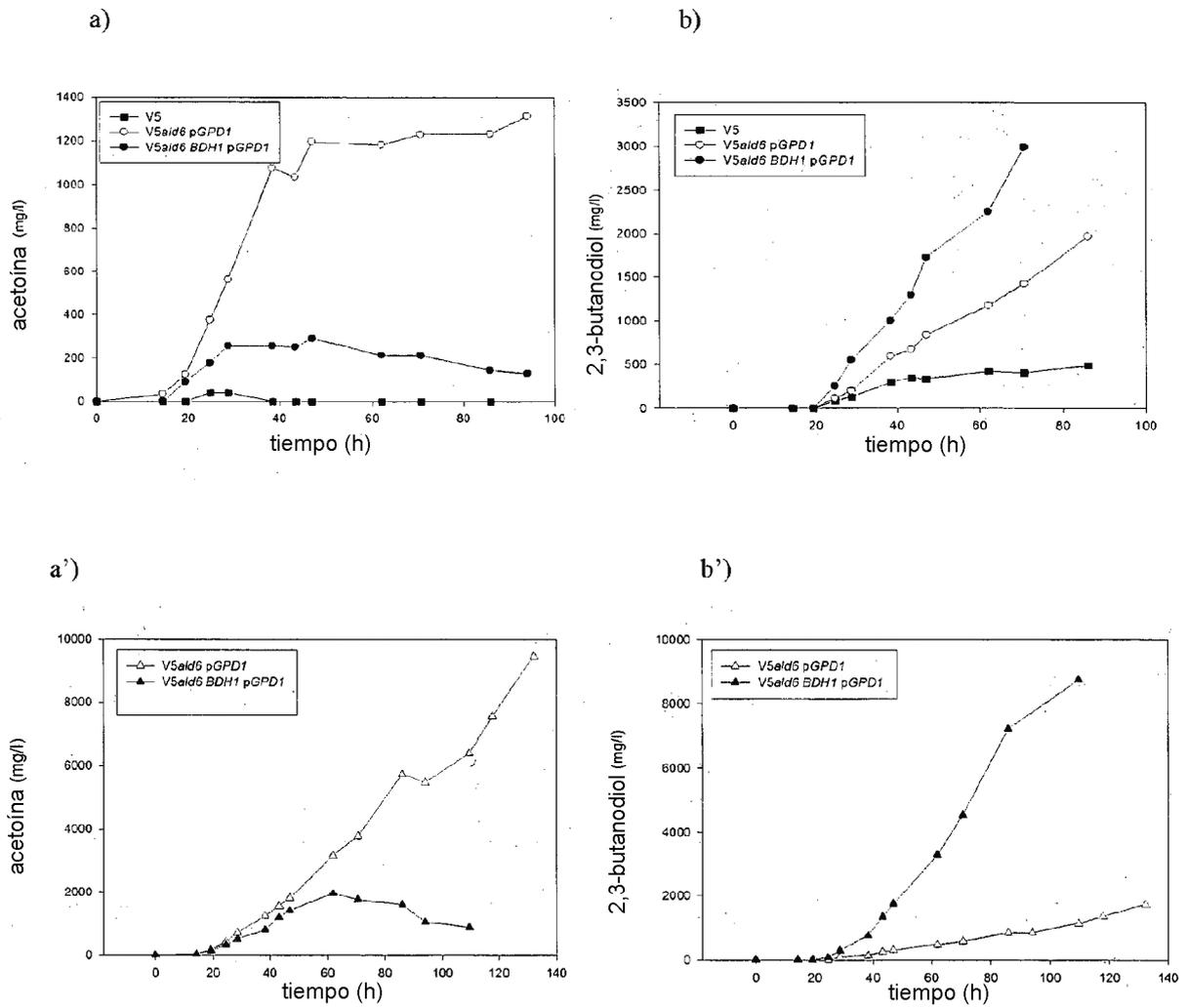


FIGURA 2

ES 2 559 064 T3

1	MRALAYFKKGD IHFTNDIPRPEIQTDDEVIIDVSWCGICGSDLHEYLDGPIFMPKDGECH	60
1	MRALAYFKKGD IHFTNDIPRPEIQTDDEVIIDVSWCGICGSDLHEYLDGPIFMPKDGECH	60
61	KLSNAALPLAMGHEMSGIVSKVGPKVTKVKVGDHVVVDAASSCADLHCWPHSKFYNSKPC	120
61	KLSNAALPLAMGHEMSGIVSKVGPKVTKVKVGDHVVVDAASSCADLHCWPHSKFYNSKPC	120
121	DACQRGSENLC THAGFVGLGVI SGGFAEQVVVSQHIIIPVPKEIPLDVAALIEPLSVTWH	180
121	DACQRGSENLC THAGFVGLGVI SGGFAEQVVVSQHIIIPVPKEIPLDVAALIEPLSVTWH	180
181	AVKISGFKKGSSALV LGAGPIGLCTILVLKMGASKIVVSEVAERRIEMAKKLGVEVFNP	240
181	AVKISGFKKGSSALV LGAGPIGLCTILVLKMGASKIVVSEVAERRIEMAKKLGVEVFNP	240
241	SKHGHKSIEILRGLTKSHDGF DYSYDCSGIQVTFETSLKALTFRGTATNIAVWGPKPVPF	300
241	SKHGHKSIEILRGLTKSHDGF DYSYDCSGIQVTFETSLKALTFRGTATNIAVWGPKPVPF	300
301	QPMDVTLQEKVMTGSIGYVVEDFEEVVRAIHNGDITMEDCKQLITGKQRIEDGWKGFQE	360
301	QPMDVTLQEKVMTGSIGYVVEDFEEVVRAIHNGDITMEDCKQLITGKQRIEDGWKGFQE	360
361	LMDHKESNVKILLTPNNHGEMK	382
361	LMDHKESNVKILLTPNNHGEMK	382

FIGURA 3

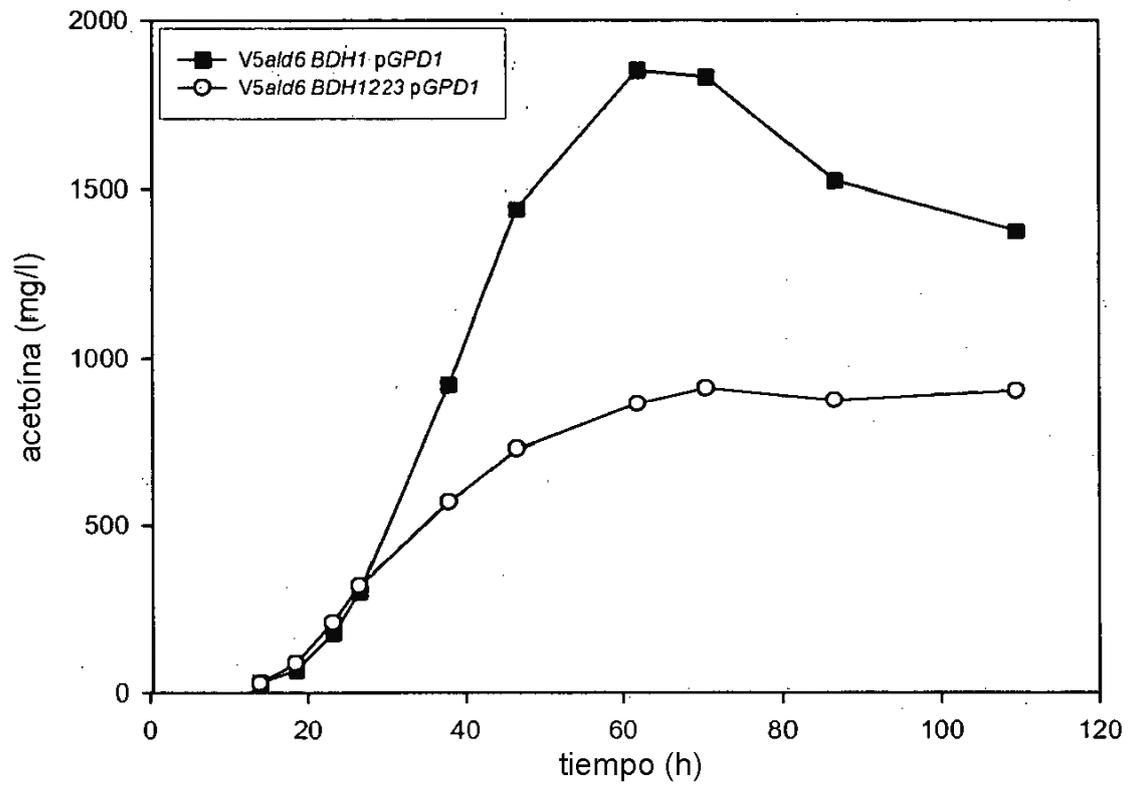


FIGURA 4

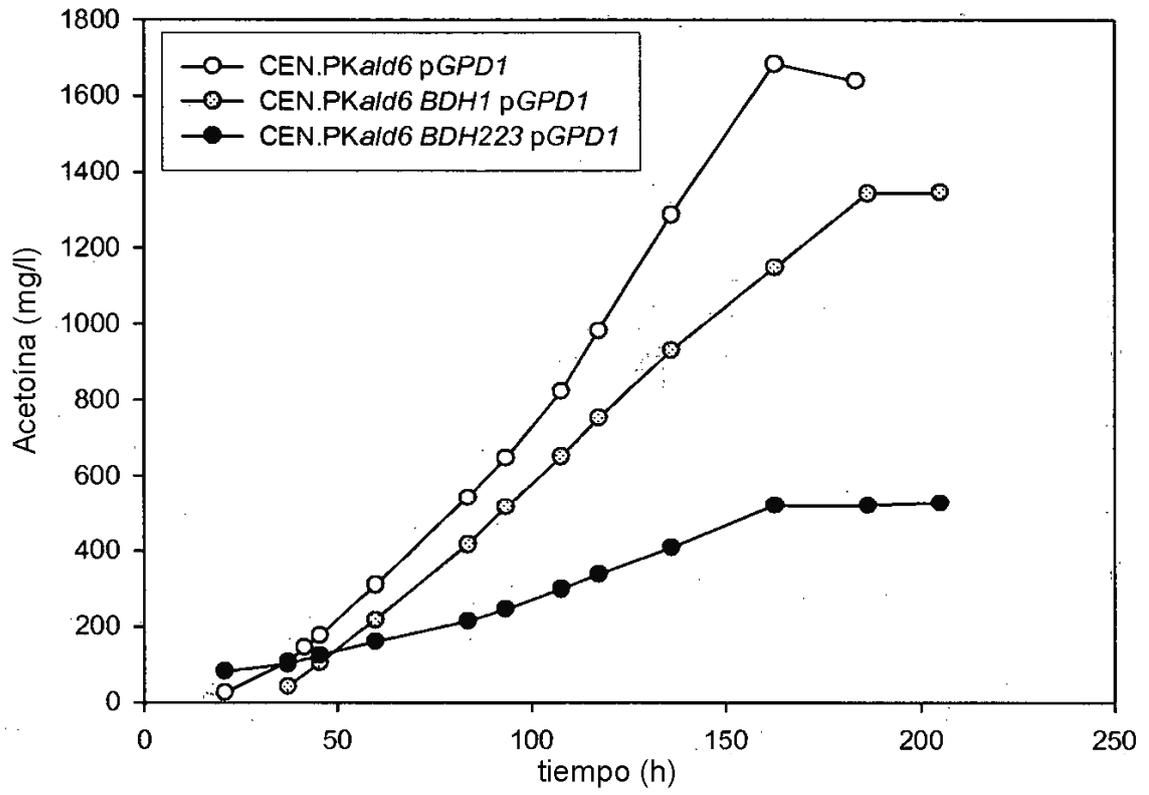


FIGURA 5

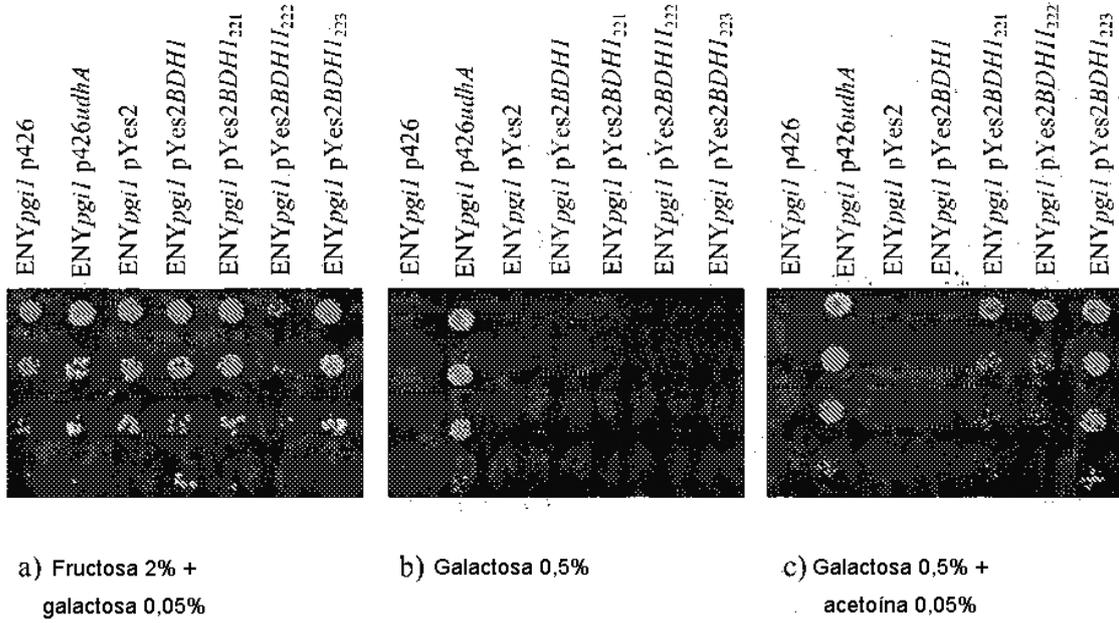


FIGURA 6

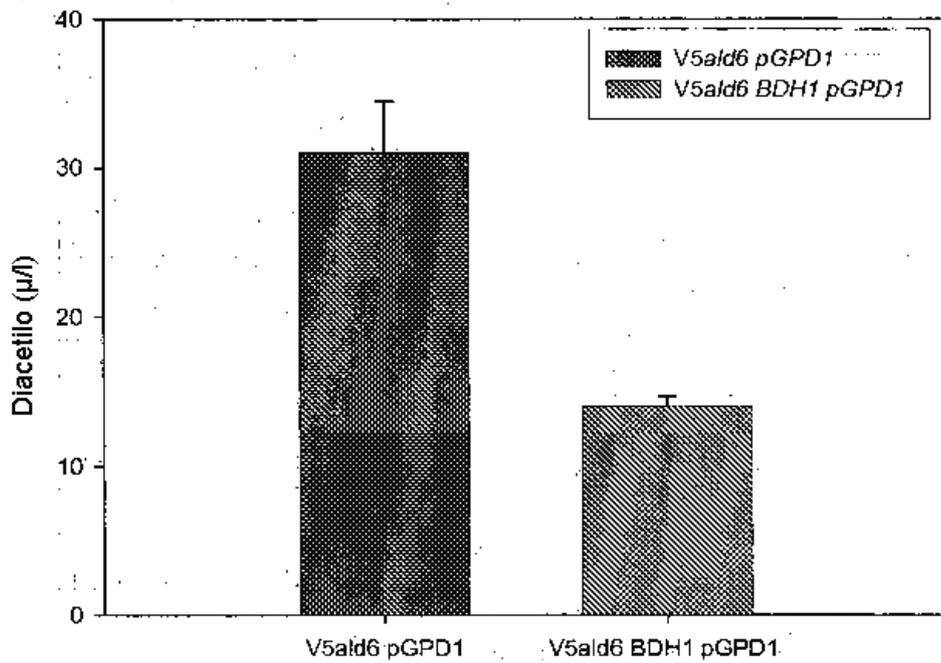


FIGURA 7