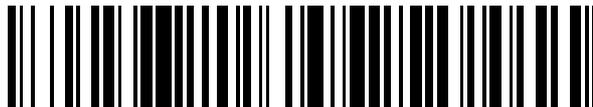


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 834**

51 Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 09721138 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2257619**

54 Título: **Utilización de un sustituto carbonado para la producción de levaduras**

30 Prioridad:

14.03.2008 FR 0801398

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

29.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FUENTES, JEAN-LUC;
PARASIE, GEORGES RENÉ MARCEL;
POILPRE, EMMANUEL;
QUIPOURT-ISNARD, ANNE-DOMINIQUE y
STIEN, GILLES GEORGES ALBERT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 564 834 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

Utilización de un sustituto carbonado para la producción de levaduras

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la producción de levaduras, especialmente a escala industrial. La presente invención tiene por objeto la utilización de un sustrato carbonado que permite reemplazar parcial o totalmente la utilización de azúcar para la producción de levaduras, especialmente a escala industrial.

Antecedentes tecnológicos

10 La producción de levaduras requiere el aporte de diferentes elementos nutritivos capaces de asegurar su crecimiento. Estos diferentes elementos nutritivos son en particular carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, minerales y vitaminas. Entre los medios naturales que se pueden utilizar para la producción de levaduras, las melazas ocupan un lugar destacado. En efecto, las melazas constituyen un medio relativamente completo capaz de asegurar el aporte de estos elementos nutritivos. La composición de las melazas es, como promedio la siguiente: de 66 % a 73 % de azúcares, de 15 % a 23 % de compuestos orgánicos y de 10 % a 12 % de compuestos inorgánicos (en porcentajes de materias secas totales). La fuente carbonada proporcionada por las melazas está esencialmente
15 constituida de sacarosa o de los azúcares que resultan de su hidrólisis (glucosa y fructosa).

Sin embargo, la escasez de las melazas de caña y de remolacha, en particular asociada a su utilización masiva para la producción de bioetanol, pone en peligro este tipo de producción. En particular, es necesario encontrar nuevos sustratos carbonados en sustitución de la sacarosa proporcionada por las melazas.

20 La producción de levaduras se puede efectuar igualmente sobre jarabes de glucosa o de fructosa, por ejemplo, procedentes de la hidrólisis del almidón y, que provienen especialmente de cereales (maíz, trigo, arroz) o de la patata. Sin embargo, estos jarabes tienen un coste relativamente elevado y no representan una solución económicamente rentable para reemplazar a la sacarosa de las melazas en el marco de una producción industrial de levadura.

25 La levadura del género *Saccharomyces* es capaz de sintetizar glicerol en condiciones anaeróbicas o en situación de estrés pronunciado, por ejemplo, en caso de estrés osmótico o térmico. La levadura *Saccharomyces* es capaz por otra parte de degradar el glicerol, pero en un metabolismo puramente oxidativo y en ausencia de represión catabólica por los azúcares. Por lo tanto, la levadura *Saccharomyces*, puesta en presencia de glicerol y de azúcar en un cultivo en lotes, no es capaz de consumir el glicerol, mientras quede azúcar en el medio.

30 Por otra parte, en el metabolismo oxidativo, la levadura *Saccharomyces* cultivada sobre un sustrato carbonado constituido únicamente de glicerol consume el glicerol muy lentamente, lo que no es compatible con una producción de levadura a escala industrial. (Lages et Lucas 1997, Biochimica et Biophysica Acta).

35 Ferreira *et al.* (FEBS Letters, 2007, 581: 1923-1927) se interesan por la dependencia de la actividad de la proteína STL1p en la levadura frente a la temperatura, y describen una cepa de *Saccharomyces* que expresa el gen STL1 en presencia de glucosa pero que no tiene represión por la glucosa a una temperatura elevada. Esta cepa de levadura no consume glicerol, pero a 37 °C, reacciona a un estrés térmico acumulando glicerol.

Yaakov Gilad *et al.* (Mol. Cell. Biol., 2003, 23: 4826-4840) han publicado un estudio sobre el papel de la proteína cinasa Hog1 de *S. cerevisiae*. Describen un mutante Hog1 (D170A, F318S) que induce la expresión del gen STL1. Sin embargo, se inhibe el crecimiento del mutante, lo que excluye todo consumo de glicerol.

40 Finalmente, Lages *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1322: 8-18) han demostrado que cuando se añade un "starter" que contiene 0,2 % de glucosa a un medio de cultivo que contiene glicerol, el *S. cerevisiae* consume la glucosa antes de consumir el glicerol

Existe por tanto una necesidad real de nuevas cepas para la producción de levaduras que permitan reemplazar total o parcialmente el azúcar como sustrato carbonado, con rendimientos de producción de levadura compatibles con una explotación económica e industrial, y/o sin pérdida de calidad de las levaduras producidas.

Resumen de la invención

La presente invención tiene por objeto proporcionar nuevas cepas de *Saccharomyces* capaces de ser producidas sobre un sustrato carbonado que permite reemplazar total y/o parcialmente la utilización de azúcar.

Un objeto de la invención es igualmente la utilización de estas cepas para la producción de levaduras, especialmente a escala industrial.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de producción de levaduras del género *Saccharomyces* sobre un sustrato carbonado que permite reemplazar total o parcialmente la utilización de azúcar, permitiendo también dicho procedimiento obtener un rendimiento similar al de una producción sobre un sustrato de tipo azúcar y/o permitiendo obtener levaduras de calidad similar.

5 La presente invención tiene por objeto una cepa de *Saccharomyces*, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, en condiciones aeróbicas, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla mientras consume el azúcar simultáneamente, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 20 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa, siendo la cepa de *Saccharomyces* una cepa modificada genéticamente para sobreexpresar el gen STL1 en presencia de azúcar o siendo seleccionada entre la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4129, la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4130 y la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4131.

15 La presente invención tiene igualmente por objeto una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que consume al menos 85 % del glicerol de la mezcla, con preferencia al menos 90 % del glicerol de la mezcla, más preferiblemente al menos 95 % del glicerol de la mezcla, todavía más preferiblemente al menos 98 % del glicerol de la mezcla.

20 La presente invención tiene igualmente por objeto una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 30 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 40 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 50 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 60 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 80 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 90 % en equivalente de sacarosa.

25 La presente invención se refiere en particular a una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se selecciona entre las especies *cerevisiae*, *boulardii*, *carlsbergensis* y *uvarum*.

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de una cepa como se ha definido anteriormente para la producción de levaduras en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

30 La presente invención tiene por objeto la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* según la invención, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

35 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras que comprende las etapas de:

introducción de una cepa de levadura del género *Saccharomyces* según la invención en un fermentador, y

40 multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

45 La presente invención tiene particularmente por objeto un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado por que al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla es consumido por dicha cepa simultáneamente con el consumo de azúcar, con preferencia al menos 85 % del glicerol de dicha mezcla, más preferiblemente al menos 90 % del glicerol de dicha mezcla, todavía más preferiblemente al menos 95 % del glicerol de dicha mezcla, todavía más preferiblemente al menos 98 % del glicerol de dicha mezcla.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado por que la multiplicación de dicha cepa se lleva a cabo según un modo semi-continuo o según un modo continuo.

50 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 8 %, en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 10 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 12 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 15 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 17 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 20 % en equivalente de sacarosa.

La presente invención tiene particularmente por objeto un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 30 % en equivalente de sacarosa.

- 5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 40 %, en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 50 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 60 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 80 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 90 % en equivalente de sacarosa.

Breve descripción de las figuras

- 10 Figura 1: Esquema de la casete de expresión utilizada para integrar el gen STL1 en el genoma de cepas de levaduras.

15 El gen STL1 está bajo control del promotor pADH1 y va seguido del terminador CYC1 de levadura. Dos fragmentos recombinogénicos (BUD5-A y BUD5-B) de 500 nucleótidos cada uno flanquean la casete de expresión, con el fin de asegurar la inserción por recombinación homóloga de la casete en el genoma de la levadura, después de transformación, al nivel del locus BUD5 (YCR038c) situado sobre el cromosoma III. El gen que confiere resistencia a la genética KANMX se inserta aguas abajo del gen STL1, flanqueado por dos sitios loxP.

- 20 Figura 2: Nivel de expresión del gen STL1 en las cepas modificadas genéticamente para expresar el gen STL1, después de cultivo en presencia de azúcar.

El gráfico representa la relación de la tasa de ARNm de cepas de levadura mutadas que expresan el gen STL1 sobre la tasa de ARNm de la cepa no mutada correspondiente (en ordenadas). 1: relación de la tasa de ARNm de la cepa depositada en la CNCM con el número I-3887 sobre la de la cepa no mutada NCYC 996; 2: relación de la tasa de ARNm de la cepa depositada en la CNCM con el número I-3888 sobre la de la cepa no mutada NCYC 995; 3: relación de la tasa de ARNm de la cepa depositada en la CNCM con el número I-3886 sobre la de la cepa no mutada I-3399.

- 25 Figura 3: Cantidad residual de glicerol, después de cultivo en modo semi-continuo, de la cepa I-3887 en comparación con la de la cepa no mutada NCYC 996, en función del tiempo. La mezcla contenía 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa. El eje de ordenadas de la izquierda indica la cantidad de glicerol (en g) y el eje de ordenadas de la derecha la cantidad de etanol (en g) en el medio libre de levaduras. El eje de abscisas indica el tiempo (en horas). La curva de triángulos representa la cantidad residual de glicerol en el medio libre de levaduras a lo largo del cultivo de la cepa no mutada NCYC 996 y la curva de cuadrados la de la cepa I-3887. La curva de círculos representa la cantidad residual de etanol en el medio libre de levaduras a lo largo del cultivo de la cepa no mutada NCYC 996 y la curva de diamantes la de la cepa I-3887.

- 35 Figura 4: Cantidad residual de glicerol, después de cultivo en modo semi-continuo, de la cepa I-3888 en comparación con la de la cepa no mutada NCYC 995, en función del tiempo. La mezcla contenía 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa. El eje de ordenadas de la izquierda indica la cantidad de glicerol (en g) y el eje de ordenadas de la derecha la cantidad de etanol (en g) en el medio libre de levaduras. El eje de abscisas indica el tiempo (en horas). La curva de triángulos representa la cantidad residual de glicerol en el medio libre de levaduras a lo largo del cultivo de la cepa no mutada NCYC 995 y la curva de cuadrados la de la cepa I-3888. La curva de círculos representa la cantidad residual de etanol en el medio libre de levaduras a lo largo del cultivo de la cepa no mutada NCYC 995 y la curva de diamantes la de la cepa I-3888.

- 40 Figura 5: Rendimiento y concentración residual de glicerol después de cultivo en quimiostato de la cepa I-3887 y de la cepa NCYC 996, en función de la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar del medio de alimentación.

El eje de ordenadas de la izquierda indica el rendimiento de la cepa en porcentaje con respecto al rendimiento de la cepa NCYC 996 cultivada en ausencia de glicerol. El eje de ordenadas de la derecha indica la concentración residual de glicerol en el medio libre de levaduras (en ppm). El eje de abscisas indica la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar en equivalente de sacarosa. El rendimiento de producción se representa por los cuadrados y la concentración residual de glicerol por los círculos. Los resultados de la cepa no mutada NCYC 996 (testigo) figuran en blanco y los de la cepa mutada correspondiente I-3887 en negro.

- 50 Figura 6: Rendimiento y concentración residual de glicerol después de cultivo en quimiostato de la cepa I-3888 y de la cepa NCYC 995, en función de la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar del medio de alimentación.

5 El eje de ordenadas de la izquierda indica el rendimiento de la cepa en porcentaje con respecto al rendimiento de la cepa NCYC 995 cultivada en ausencia de glicerol. El eje de ordenadas de la derecha indica la concentración residual de glicerol en el medio libre de levaduras (en ppm). El eje de abscisas indica la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar en equivalente de sacarosa. El rendimiento de producción se representa por los cuadrados y la concentración residual de glicerol por los círculos. Los resultados de la cepa no mutada NCYC 995 (testigo) figuran en blanco y los de la cepa mutada correspondiente I-3888 en negro.

Figura 7: Porcentaje de glicerol consumido después de cultivo en quimiostato de la cepa I-3887 y de la cepa NCYC 996, en función de la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar del medio de alimentación.

10 El porcentaje de glicerol consumido (en ordenadas) se da en función de la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar en equivalente de sacarosa (en abscisas). El porcentaje de glicerol consumido por la cepa no mutada NCYC 996 (testigo) se representa en blanco y el de la cepa mutada correspondiente I-3887 en rayado.

Figura 8: Porcentaje de glicerol consumido después de cultivo en quimiostato de la cepa I-3888 y de la cepa NCYC 995, en función de la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar del medio de alimentación.

15 El porcentaje de glicerol consumido (en ordenadas) se da en función de la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar en equivalente de sacarosa (en abscisas). El porcentaje de glicerol consumido por la cepa no mutada NCYC 995 (testigo) se representa en blanco y el de la cepa mutada correspondiente I-3888 en rayado.

Figura 9: Porcentaje de glicerol consumido después de cultivo en modo semi-continuo de variantes naturales en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa.

20 El porcentaje de glicerol consumido (en ordenadas) se indica para diferentes variantes naturales ensayados (1 a 53). Se indica igualmente el porcentaje de glicerol consumido por la cepa no mutada de la que proceden las variantes naturales (señalada como T).

Descripción detallada de la invención

25 Se describe aquí una cepa de *Saccharomyces*, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, en condiciones aeróbicas, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 20 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

30 De manera sorprendente e inesperada, los inventores han obtenido cepas de levadura de *Saccharomyces* capaces de consumir al menos 80 % del glicerol de una mezcla de glicerol y de azúcar, simultáneamente con su consumo de azúcar, en condiciones aeróbicas, en un cultivo semi-continuo o continuo.

35 Los inventores han demostrado en efecto que levaduras de panadería industriales clásicas, como las cepas depositadas en la NCYC (National Collection of Yeast Cultures) con los números NCYC 995 y NCYC 996, no consumen el glicerol más que parcialmente en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar en cultivo semi-continuo y/o en cultivo continuo (véase el ejemplo 2). Al final del cultivo, el medio de cultivo libre de levaduras contiene entonces una alta cantidad residual de glicerol que se ha acumulado a lo largo del cultivo.

Las cepas según la invención se caracterizan por el hecho de que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, consumen al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, siendo dado el porcentaje en peso/peso. En otros términos, la cepa según la invención consume al menos 80 % de la masa total de glicerol presente en la mezcla de glicerol y de azúcar.

40 La presente invención tiene particularmente por objeto una cepa de *Saccharomyces*, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, en condiciones aeróbicas, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol del 20 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

45 La determinación del consumo de glicerol se puede realizar por una medida de la cantidad residual de glicerol en el medio de cultivo, después de un cultivo semi-continuo, o por una medida de la cantidad residual de glicerol en el medio trasegado en el caso de un cultivo continuo.

En el caso de un cultivo semi-continuo, la medida de la cantidad residual de glicerol en el medio de cultivo se realiza al final del cultivo.

50 Por "final del cultivo" se designa el momento en que se detiene la alimentación de azúcar.

La duración del cultivo es en particular inferior o igual a la duración de un cultivo de la misma cepa sobre una mezcla que comprende 100 % de azúcar en equivalente de sacarosa.

La duración del cultivo es, en particular, inferior a 24 h.

La duración del cultivo es en particular superior a 20 h.

5 La duración del cultivo es, por ejemplo, de 22 h.

En el caso de un cultivo continuo, la cantidad residual de glicerol se mide en cualquier momento, una vez que se alcanza el estado estacionario.

El estado estacionario se alcanza cuando las concentraciones en el fermentador son estables durante al menos 3 tiempos de residencia, siendo el tiempo de residencia la relación $1/[tasa\ de\ dilución]$.

10 De forma convencional, las condiciones de cultivo son tales que el metabolismo de la cepa de levadura es esencialmente respiratorio y/o tales que no hay esencialmente producción de etanol.

El término "esencialmente" significa que estas condiciones se verifican durante el período total de cultivo, pero que es posible que, puntualmente, estas condiciones no se verifiquen en modo semi-continuo, por ejemplo, durante las primeras horas de cultivo, especialmente durante un período de tiempo comprendido entre 1/4 y 1/3 de la duración del cultivo, y en particular durante las 5 primeras horas de un cultivo en modo semi-continuo.

15

En una realización en quimiostato, las condiciones de cultivo son tales que el metabolismo de la cepa de levadura es respiratorio y/o tales que no hay producción de etanol cuando se alcanza el estado estacionario.

La expresión "el metabolismo de la cepa de levadura es esencialmente respiratorio" significa que el carbono es oxidado y no fermentado, durante el período total de cultivo, pudiendo ser fermentada de manera transitoria una parte del carbono.

20

La expresión "esencialmente no hay producción de etanol" significa que la concentración de etanol al final del cultivo es inferior a 1 %, con preferencia inferior a 0,1 %, más preferiblemente inferior a 0,01 %, más preferiblemente inferior a 0,001 %.

Los expertos en la técnica saben cómo regular los parámetros de cultivo de una cepa de levadura dada, para que las condiciones de cultivo sean tales que el metabolismo de dicha cepa sea esencialmente respiratorio y/o tales que no haya esencialmente producción de etanol.

25

La cantidad residual de glicerol se mide con preferencia en el medio de cultivo libre de levaduras.

La cantidad residual de glicerol en el medio de cultivo se mide, por ejemplo, por cromatografía HPLC o CPG, valoración enzimática o cualquier otro método apropiado.

30 Las cepas de levadura según la invención son por tanto particularmente interesantes ya que son capaces de consumir el glicerol continuamente, durante un tiempo de producción compatible con una explotación industrial.

La expresión "capaces de consumir el glicerol continuamente" significa que esencialmente no hay acumulación de glicerol durante el período total de cultivo, pero que es posible una acumulación puntual si el metabolismo de la levadura no es esencialmente respiratorio y/o si hay una producción de alcohol.

35 Por la expresión "mezcla de glicerol y de azúcar" se indica una mezcla constituida por glicerol y azúcar en proporciones variables, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

La mezcla de glicerol y de azúcar constituye la única fuente de azúcar y de glicerol en el medio de cultivo.

La mezcla de glicerol y de azúcar se prepara, con preferencia, antes de su introducción en el medio de cultivo.

40 El glicerol, llamado también glicerina o propan-1,2,3-triol es un poliol. El glicerol puro se presenta en forma de un líquido transparente y viscoso y es soluble en agua.

El glicerol según la invención se puede utilizar en forma pura y/o en la forma de un producto que contiene glicerol, y/o puede ser aportado bajo cualquier forma capaz de dar glicerol.

45 El azúcar es con preferencia un azúcar inmediatamente asimilable por la levadura, especialmente un azúcar simple de tipo glucosa, fructosa, sacarosa, y/o una mezcla de estos azúcares.

El azúcar puede ser aportado en forma de jarabes de glucosa y/o de jarabes de fructosa, y/o de hidrolizados de almidón y/o en forma de melazas y/o en forma de una sustancia capaz de dar azúcares asimilables por la cepa de levadura y/o en forma de una mezcla de los mismos.

El azúcar se aporta con preferencia en la forma de melazas.

5 La mezcla de glicerol y de azúcar constituye al menos 90 % de la fuente de carbono para la levadura, con preferencia al menos 95 % de la fuente de carbono, más preferiblemente al menos 98 % de la fuente de carbono. La fuente de carbono en el medio de cultivo, aparte de la mezcla de glicerol y de azúcar comprende, por ejemplo, aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos presentes de forma natural en las melazas o en los hidrolizados brutos de origen agrícola.

10 La expresión "siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa" significa que cuando la proporción de glicerol expresada en equivalente de sacarosa es x %, la proporción de azúcar en la mezcla expresada en equivalente de sacarosa es (100-x) %.

15 La equivalencia se determina en la presente memoria con respecto al metabolismo de la glucólisis, según el cual un mol de sacarosa se convierte en un mol de fructosa y un mol de glucosa, que se convierten a su vez en cuatro moles de piruvato (véase Principes de la Biochimie, Lehninger, 1994).

Un mol de glucosa se convierte por lo tanto en dos moles de piruvato y un mol de fructosa en dos moles de piruvato.

Según este mismo metabolismo, un mol de glicerol se convierte en un mol de piruvato.

Así, cuatro moles de glicerol corresponden a un mol de equivalente de sacarosa.

Dos moles de glucosa corresponden a un mol de equivalente de sacarosa.

20 Dos moles de fructosa corresponden a un mol de equivalente de sacarosa.

1,076 g de glicerol corresponden aquí a un gramo de equivalente de sacarosa.

25 Por ejemplo, un kilogramo de una mezcla que contiene al final 250 g/kg de equivalente de sacarosa y una proporción de 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa, está constituido por lo tanto por 50 g de equivalente de sacarosa en forma de glicerol y 200 g de equivalente de sacarosa en forma de azúcar. Dada una melaza bruta que tiene un contenido en azúcar de 500 g/kg en equivalente de sacarosa, para preparar un kilogramo de esta mezcla, se procede en primer lugar a la mezcla de $50 \cdot 1,076 \text{ g} = 54 \text{ g}$ de glicerol puro (lo que corresponde a 50 g de equivalente de sacarosa en la forma de glicerol) y 400 g de dicha melaza bruta (lo que corresponde a 200 g de equivalente de sacarosa en la forma de azúcar), después se añade agua pura para alcanzar una masa final de mezcla de 1 kilogramo.

30 El medio de cultivo se denomina aquí medio de cultivo fresco cuando no ha sido puesto en presencia de cepas de levadura.

El medio de cultivo se denomina aquí medio de reacción cuando ha sido puesto en presencia de cepas de levadura.

La cepa de levadura según la invención se pone en presencia del medio de cultivo en condiciones aeróbicas.

35 Con preferencia, la cepa de levadura según la invención se pone en presencia del medio de cultivo en un fermentador adecuado para la producción de levaduras. El volumen del fermentador puede variar de algunos mililitros hasta varios metros cúbicos.

El fermentador se denomina también reactor en lo sucesivo.

El fermentador está adaptado con preferencia para un cultivo en condiciones aeróbicas.

40 La cepa de levadura se pone con preferencia en presencia del medio de cultivo en el marco de un cultivo en modo semi-continuo y/o en modo continuo.

45 Por la expresión "cultivo en modo semi-continuo" o "cultivo semi-continuo" o "modo semi-continuo", también llamado "lote alimentado" se designa aquí un cultivo en un fermentador que es alimentado progresivamente por el medio de cultivo, pero del cual no se retira ningún volumen de medio. En un procedimiento de este tipo, el volumen de cultivo es variable (y por lo general creciente) en el fermentador. El caudal de alimentación en un cultivo en modo semi-continuo es constante o variable.

Un ejemplo de cultivo semi-continuo es un cultivo realizado en las condiciones descritas en el libro de referencia "Yeast Technology", Capítulo 6, 2ª edición, 1991, G. Reed et T.W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442 -31892-8.

5 Por la expresión "cultivo en modo continuo" o "cultivo continuo" o "modo continuo" se designa aquí un cultivo en un fermentador en el curso del cual el fermentador es alimentado con medio de cultivo fresco y donde una parte del medio de reacción se trasiega. En un cultivo en modo continuo, el volumen de cultivo en el fermentador es variable o constante.

Según un modo de realización particular del cultivo en modo continuo, el caudal de alimentación y el caudal de trasiego son iguales.

10 Un ejemplo de cultivo continuo es un cultivo realizado en las condiciones descritas en el libro de referencia "Yeast Technology", Capítulo 6, 2ª edición, 1991, G. Reed et T. W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

El cultivo en quimiostato es una forma especial de cultivo continuo.

15 En un cultivo en quimiostato, los diferentes parámetros tales como la tasa de oxígeno disuelto, las concentraciones de nutrientes, el pH, la densidad celular, se mantienen constantes.

El medio de cultivo comprende como constituyentes la mezcla de glicerol y de azúcar y los demás elementos necesarios para el crecimiento de las levaduras.

20 Los otros elementos necesarios para el crecimiento de las levaduras son las siguientes: al menos una fuente de nitrógeno, al menos una fuente de azufre, al menos una fuente de fósforo, al menos una fuente de vitaminas y/o al menos una fuente de minerales.

Estos otros elementos se aportan en cantidades suficientes para no constituir un factor limitante del crecimiento de las levaduras y para mantener un metabolismo esencialmente respiratorio.

La fuente de nitrógeno es aportada, por ejemplo, en la forma de sulfato de amonio, hidróxido de amonio, fosfato de di-amonio, amoniaco, urea y/o una combinación de los mismos.

25 La fuente de azufre es aportada, por ejemplo, en la forma de sulfato de amonio, sulfato de magnesio, ácido sulfúrico y/o una combinación de los mismos.

La fuente de fósforo es aportada, por ejemplo, en la forma de ácido fosfórico, fosfato de potasio, fosfato de di-amonio, fosfato de mono-amonio, y/o una combinación de los mismos.

30 La fuente de vitaminas es aportada, por ejemplo, en la forma de melazas, hidrolizado de levadura, solución de vitamina pura o una mezcla de vitaminas puras y/o una combinación de las mismas.

La fuente de vitaminas aporta a la levadura el conjunto de las vitaminas en cantidades al menos equivalentes a las recomendadas en las obras de referencia. Se pueden asociar varias fuentes de vitaminas.

La fuente de minerales es aportada por ejemplo en la forma de melazas, una mezcla de sales minerales y/o su combinación.

35 La fuente de minerales aporta a la levadura el conjunto de los macroelementos y oligoelementos en cantidades al menos equivalentes a las recomendadas en las obras de referencia. Se pueden asociar varias fuentes de minerales.

Una misma sustancia puede aportar varios elementos diferentes.

40 Las cepas de levadura según la invención se seleccionan en particular entre las cepas que permiten producir la levadura de panadería, la levadura de cerveza, la levadura de enología, la levadura para la producción de alcohol, y/o la levadura para la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, para la producción de proteínas terapéuticas.

45 El consumo de glicerol de una cepa de *Saccharomyces* se puede medir, por ejemplo, en las condiciones descritas en el ejemplo 2, para determinar si dicha cepa en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, en condiciones aeróbicas, consume al menos 80 % del glicerol de la mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

- 5 Se describe también en la presente memoria una cepa de *Saccharomyces*, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, en condiciones aeróbicas, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de 30 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.
- 10 Se describe igualmente en la presente memoria una cepa de *Saccharomyces*, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, en condiciones aeróbicas, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de 40 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.
- 15 Se describe aquí, en particular, una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que consume al menos 85 % del glicerol de la mezcla, con preferencia al menos 90 % del glicerol de la mezcla, más preferiblemente al menos 95 % del glicerol de la mezcla, todavía más preferiblemente al menos 98 % del glicerol de la mezcla.
- 20 Se describe también en la presente memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 30 % en equivalente de sacarosa, preferiblemente al menos 40 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 50 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 60 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 80 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 90 % en equivalente de sacarosa.
- 25 Se describe también en la presente memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la proporción de glicerol en dicha mezcla es como máximo de 95 % en equivalente de sacarosa, con preferencia como máximo 90 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente como máximo 85 % en equivalente de sacarosa.
- La presente invención tiene particularmente por objeto una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la proporción de glicerol en dicha mezcla está comprendida entre 20 % y 90 % en equivalente de sacarosa, con preferencia de 20 % a 80 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente de 30 % a 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente de 30 % a 60 % en equivalente de sacarosa.
- Se describe en la presente memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se selecciona entre las especies *cerevisiae*, *boulardii*, *carlsbergensis* y *uvarum*.
- Una cepa preferida según la invención es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 30 Se describe en la presente memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se selecciona entre una variante natural y/o una cepa modificada genéticamente.
- El término "variante natural" designa aquí una cepa obtenida por cruce y/o hibridación de cepas de levadura y/o obtenida por mutación espontánea y/o por mutagénesis aleatoria, por ejemplo, después de una exposición a condiciones de estrés, a un tratamiento UV o a un tratamiento con agentes mutagénicos.
- 35 El patrimonio genético de una variante natural no ha sido modificado por ingeniería genética.
- Se pueden utilizar, por ejemplo, dos métodos de mutagénesis aleatoria para obtener las variantes naturales de la invención (véase también el ejemplo 3 a continuación).
- El primer método consiste en una selección de las variantes naturales sobre la base de su consumo de glicerol y de su rendimiento, directamente después de una exposición a la radiación UV seguida por el aislamiento de clones.
- 40 El segundo método comprende:
- una primera etapa de exposición a la radiación UV,
 - una segunda etapa de cultivo en quimiestato en presencia de una mezcla de azúcar y glicerol,
 - una tercera etapa de aislamiento de clones, y
 - una cuarta etapa de selección de las variantes naturales sobre la base de su consumo de glicerol y de su rendimiento.
- 45 Este segundo método permite enriquecer el cultivo en variantes naturales que consumen el glicerol en presencia de azúcar, antes de comenzar la etapa de selección.

La invención tiene así particularmente por objeto la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4129, la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4130 y la cepa depositada el 3 marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4131.

5 Estas tres cepas han sido obtenidas por mutagénesis aleatoria después de un tratamiento UV y selección sobre la base de su consumo de glicerol y de su rendimiento (véase el ejemplo 3).

La presente invención tiene por objeto una variante natural como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa número CNCM I-4129.

10 En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-4129 consume más de 95 % del glicerol de la mezcla.

En cultivo continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar, la cepa de levadura CNCM I-4129 consume más de 80 % del glicerol de la mezcla, cuando la proporción de glicerol en dicha mezcla varía de 20 % a 50 %.

15 La presente invención tiene por objeto una variante natural como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa CNCM I-4130.

En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-4130 consume más de 95 % del glicerol de la mezcla.

20 En cultivo continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar, la cepa de levadura CNCM I-4130 consume más de 80 % del glicerol de la mezcla, cuando la proporción de glicerol en dicha mezcla varía de 20 % a 50 %.

La presente invención tiene por objeto una variante natural como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa número CNCM I-4131.

25 En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-4131 consume más de 95 % del glicerol de la mezcla.

En cultivo continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar, la cepa de levadura CNCM I-4131 consume más de 80 % del glicerol de la mezcla, cuando la proporción de glicerol en dicha mezcla varía de 20 % a 50 %.

30 Por la expresión "cepa modificada genéticamente" o cepa OGM se designa una cepa cuyo patrimonio genético ha sido modificado por ingeniería genética.

Una cepa modificada genéticamente puede haber sufrido una modificación de su ADN endógeno, por ejemplo por una mutación puntual, parcial o total de un gen. La mutación puede consistir en una inserción, delección y/o sustitución de al menos un nucleótido.

35 La mutación induce con preferencia una modificación del producto génico después de la transcripción y/o traducción. La mutación puede arrastrar, especialmente un truncamiento del producto génico, una modificación de al menos un aminoácido en la secuencia del producto génico y/o un desajuste del marco de lectura durante la transcripción.

Una cepa modificada genéticamente puede incluir un ADN exógeno, integrado o no en al menos un cromosoma de la levadura y/o en al menos un plásmido de la levadura.

40 Una cepa modificada genéticamente preferida, incluye un ADN exógeno integrado en al menos un cromosoma de la levadura.

El ADN exógeno puede ser un fragmento de ADN, - por ejemplo, un fragmento de gen, una casete de expresión total o parcial - y/o un plásmido.

45 Cuando la cepa modificada genéticamente incluye un ADN exógeno integrado, se trata de una integración única o de una integración multicopias.

Se describe en la presente memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de una cepa modificada genéticamente a nivel de al menos un gen implicado en al menos una vía metabólica del glicerol.

- Se describe en la presente memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de una cepa modificada genéticamente a nivel de al menos un gen implicado en el catabolismo del glicerol o en la regulación del catabolismo del glicerol.
- 5 Se describe en particular aquí, una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de una cepa modificada genéticamente a nivel de al menos un gen seleccionado entre los genes STL1, GUP1, GUP2, GUT1, GUT2, FPS1 y/o ADR1 y/o un gen implicado en la represión por la glucosa y/o de una combinación de los mismos.
- 10 Una cepa modificada genéticamente según la invención presenta especialmente un aumento de la expresión de un gen y/o una disminución de la expresión de un gen y/o una expresión constitutiva y/o una expresión diferencial de un gen, y/o la expresión de un gen ausente en la cepa de levadura de origen.
- Se describe en particular en la presente memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de una cepa modificada genéticamente a nivel de al menos un gen seleccionado entre los genes STL1, GUP1, GUP2, GUT1, GUT2 y/o de una combinación de los mismos.
- 15 La modificación de las cepas según la invención se efectúa utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (véase Molecular Cloning, 3rd edition, Sambrook et Russel).
- Una cepa de levadura modificada genéticamente como se describe aquí consume con preferencia más de 90 % del glicerol de la mezcla de glicerol y de azúcar.
- El gen STL1 codifica la glicerol-permeasa que permite en particular la entrada del glicerol en la célula.
- 20 Una cepa según la invención modificada genéticamente a nivel del gen STL1 expresa el gen STL1 en presencia de azúcar.
- Una cepa modificada genéticamente a nivel del gen STL1 preferida según la invención sobreexpresa el gen STL1 en presencia de azúcar con respecto a la cepa no mutada correspondiente.
- El gen STL1 en la cepa modificada genéticamente según la invención está situado, por ejemplo, bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducido por la glucosa.
- 25 Una cepa modificada genéticamente a nivel del gen STL1 preferida según la invención, presenta una tasa de transcripción del gen STL1 multiplicada al menos por 100 con respecto a la de la cepa no mutada correspondiente, con preferencia multiplicada al menos por 200, más preferiblemente al menos por 250, siendo calculada la tasa de transcripción después de una PCR cuantitativa sobre el ADNc obtenido por transcripción inversa.
- El gen GUP1 codifica una proteína de membrana implicada en el transporte activo del glicerol en la célula.
- 30 Una cepa modificada genéticamente a nivel de GUP1 expresa el gen GUP1 en presencia de azúcar.
- El gen GUP2 codifica una proteína de membrana implicada en el transporte activo de glicerol en la célula.
- Una cepa modificada genéticamente a nivel de GUP2 expresa el gen GUP2 en presencia de azúcar.
- El gen FPS1 o YLL043W codifica una proteína de membrana de transporte que permite en particular la exportación de glicerol.
- 35 Una cepa modificada genéticamente a nivel de FPS1 no expresa el gen FPS1, por ejemplo, debido a una delección del gen.
- El gen ADR1 o YDR216W codifica un activador de transcripción implicado en la expresión de genes implicados en las rutas de utilización del etanol, del glicerol y de los ácidos grasos. Dichos genes están especialmente regulados por represión por la glucosa.
- 40 Una cepa modificada genéticamente a nivel de ADR1 expresa el gen ADR1 en presencia de azúcar.
- El gen GUT1 o YHL032C codifica una glicerol-cinasa que convierte el glicerol en glicerol-3-fosfato.
- Una cepa modificada genéticamente a nivel de GUT1 expresa el gen GUT1 en presencia de azúcar.
- El gen GUT2 o YIL155C codifica la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa, que convierte el glicerol-3-fosfato en DHAP (dihidroxiacetona-fosfato).
- 45 Una cepa modificada genéticamente a nivel de GUT2 expresa el gen GUT2 en presencia de azúcar.

Una cepa se modifica, por ejemplo, por transformación con una casete de expresión que permite la expresión de un gen como se ha definido anteriormente, en particular en presencia de azúcar.

La casete de expresión comprende un promotor, un gen de interés y un terminador. El terminador es una secuencia artificial o una secuencia terminadora de la levadura.

5 El promotor es un promotor constitutivo o inducible.

Un promotor preferido es el promotor pADH1 inducible por la glucosa.

La presente invención tiene por objeto una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa depositada el 20 de diciembre 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3886.

10 La cepa de levadura número CNCM I-3886 se ha obtenido por integración de la casete de expresión representada en la figura 2 en el genoma de la cepa depositada en la CNCM con el número CNCM I-3399.

La cepa de levadura número CNCM I-3886 expresa el gen STL1 fuertemente en presencia de azúcar (tasa de ARNm más de 270 veces superior a la de la cepa no mutada I-3399).

15 En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-3886 consume más de 95 % del glicerol de la mezcla.

En cultivo continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar, la cepa de levadura CNCM I-3886 consume más de 90 % del glicerol de la mezcla, cuando la proporción de glicerol en dicha mezcla varía de 20 % a 80 %.

20 La presente invención tiene por objeto una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3887.

La cepa de levadura número CNCM I-3887 se ha obtenido por integración de la casete de expresión representada en la figura 2 en el genoma de la cepa depositada en la NCYC (National Collection of Yeast Cultures) con el número NCYC 996.

25 La cepa de levadura número CNCM I-3887 expresa el gen STL1 fuertemente en presencia de azúcar (tasa de ARNm más de 270 veces superior a la de la cepa no mutada NCYC 996).

En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-3887 consume más de 95 % del glicerol de la mezcla.

30 En cultivo continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar, la cepa de levadura CNCM I-3887 consume más de 90 % del glicerol de la mezcla, cuando la proporción de glicerol en dicha mezcla varía de 20 % a 80 %.

La presente invención tiene por objeto una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3888.

35 La cepa de levadura número CNCM I-3888 se ha obtenido por integración de la casete de expresión representada en la figura 2 en el genoma de la cepa depositada en la NCYC (National Collection of Yeast Cultures) con el número NCYC 995.

La cepa de levadura número CNCM I-3888 expresa por tanto el gen STL1 fuertemente en presencia de azúcar (tasa de ARNm más de 300 veces superior a la de la cepa no mutada NCYC 995).

40 En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-3888 consume más de 95 % del glicerol de la mezcla.

En cultivo continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar, la cepa de levadura CNCM I-3888 consume más de 90 % del glicerol de la mezcla, cuando la proporción de glicerol en dicha mezcla varía de 20 % a 80 %.

45 Se describe en esta memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4132.

La cepa de levadura CNCM I-4132 se ha obtenido por integración de la casete de expresión representada en la figura 2 en el genoma de la cepa depositada el 4 de septiembre de 2008 en la CNCM con el número I-4072.

La cepa de levadura número CNCM I-4132 expresa por tanto el gen STL1 fuertemente en presencia de azúcar (tasa de ARNm más de 200 veces superior a la de la cepa no mutada I-4072).

- 5 En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-4132 consume más de 80 % del glicerol de la mezcla.

Se describe en esta memoria una cepa como se ha definido anteriormente, caracterizada por que se trata de la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4133.

- 10 La cepa de levadura CNCM I-4133 se ha obtenido por integración de la casete de expresión representada en la figura 2 en el genoma de la cepa depositada el 4 de septiembre de 2008 en la CNCM con el número I-4071.

La cepa de levadura número CNCM I-4133 expresa el gen STL1 fuertemente en presencia de azúcar (tasa de ARNm más de 200 veces superior a la de la cepa no mutada I-4071).

- 15 En cultivo semi-continuo, en un medio de cultivo que contiene una mezcla de glicerol y de azúcar con una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, la cepa de levadura CNCM I-4133 consume más de 80 % del glicerol de la mezcla.

- 20 Se describe igualmente por objeto en esta memoria, una cepa de *Saccharomyces* derivada de la cepa CNCM I-3886, de la cepa CNCM I-3887, de la cepa CNCM I-3888, de la cepa CNCM I-4132, de la cepa CNCM I-4133, de la cepa CNCM I-4129, de la cepa CNCM I-4130 o de la cepa CNCM I-4131, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 20 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

- 25 Se describe igualmente en esta memoria una cepa de *Saccharomyces* derivada de la cepa CNCM I-3886, de la cepa CNCM I-3887, de la cepa CNCM I-3888, de la cepa CNCM I-4132, de la cepa CNCM I-4133, de la cepa CNCM I-4129, de la cepa CNCM I-4130 o de la cepa CNCM I-4131, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

- 30 Por la expresión "cepa derivada" se designa una cepa derivada mediante cualquier transformación, como por ejemplo, por uno o varios cruces y/o por mutación y/o por transformación genética.

- 35 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de una cepa de levadura de la invención, para la producción de levaduras en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

La presente invención tiene especialmente por objeto la utilización de una cepa de levadura de la invención, para la producción industrial de levaduras en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar.

- 40 La presente invención tiene por objeto la utilización de una cepa de levadura de la invención, para la producción de levaduras, siendo efectuada la producción según un esquema clásico bien conocido por los expertos en la técnica, pero realizada en condiciones aeróbicas y utilizando una mezcla de glicerol y de azúcar como fuente de carbono.

- 45 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces*, caracterizada por que dicha cepa consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

Dicha utilización es especialmente interesante para la producción de levaduras a escala industrial.

La expresión al menos una cepa de *Saccharomyces* significa que la producción de levaduras se puede realizar a partir de varias cepas de levaduras diferentes, de la misma especie o de especie diferente.

Con preferencia, la producción de levaduras se realiza a partir de una sola cepa de levadura.

La mezcla de glicerol y de azúcar es como se ha definido anteriormente.

Se describe en la presente memoria la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la producción de levaduras se realiza según un modo semi-continuo o continuo.

- 5 Se describe igualmente en la presente memoria la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la producción de levaduras se realiza en condiciones aeróbicas.

10 Se describe también aquí la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la producción de levaduras se realiza durante un periodo de tiempo con preferencia inferior a 48 h, más preferiblemente inferior a 36 h, todavía más preferiblemente inferior a 24 horas.

De manera ventajosa, la duración de la producción está comprendida entre 10 h y 24 h.

La duración de la producción es, por ejemplo, de 22 h.

- 15 Se describe en la presente memoria la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que el rendimiento de producción es similar al obtenido con una cepa de levadura estándar producida en ausencia de glicerol.

Por ejemplo, el rendimiento de producción de levaduras es superior al 85 %, con preferencia superior al 90 %, más preferiblemente superior al 95 % del rendimiento de una cepa estándar producido en ausencia de glicerol.

- 20 Por cepa estándar, se designa por ejemplo la levadura de panadería, depositada en la NCYC con el número NCYC 995.

Por "rendimiento" o "rendimiento de producción" o "rendimiento de producción de biomasa": se designa la relación de la masa de levadura producida sobre la masa de equivalente en sacarosa procesada.

La masa de equivalente de sacarosa procesada está constituida por la masa de equivalente de sacarosa consumida y la no consumida.

- 25 El medio de cultivo es como se ha definido anteriormente.

30 Según otro modo de realización, se describe aquí la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que el medio de cultivo comprende otra fuente de carbono asimilable por la cepa de levadura. Otra fuente de carbono asimilable por la cepa de levadura es, por ejemplo, el etanol. En tal modo de realización, la mezcla de glicerol y de azúcar constituye al menos 70 % de la fuente de carbono para la levadura, con preferencia al menos 80 % de la fuente de carbono para la levadura, más preferiblemente al menos 90 % de la fuente de carbono para la levadura.

Se describe aquí la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la totalidad del medio de cultivo no se pone en presencia de la cepa de levadura desde el inicio del cultivo.

- 35 El medio de cultivo se pone con preferencia en presencia de la cepa de levadura de manera escalonada en el tiempo, a un caudal constante o variable, pudiendo ser añadidos los diferentes constituyentes del medio de cultivo al mismo tiempo o por separado.

40 Se describe en la presente memoria la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la mezcla de glicerol y de azúcar se introduce en el medio de cultivo de manera escalonada en el tiempo.

Se describe en la presente memoria la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la mezcla de glicerol y de azúcar se introduce en el medio de cultivo por separado de los otros constituyentes del medio de cultivo.

- 45 Se describe en la presente memoria la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la mezcla de glicerol y de azúcar se prepara antes de su introducción en el medio de cultivo y/o se forma en el medio de cultivo cuando el glicerol y el azúcar se aportan por separado.

Se describe en la presente memoria la utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizada por que la cepa no se pone en cultivo en presencia de la totalidad del glicerol y/o de la totalidad del azúcar de la mezcla desde el principio del cultivo.

5 La presente invención tiene particularmente por objeto la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* de la invención, caracterizada por que dicha cepa consume al menos 85 % del glicerol de la mezcla, con preferencia al menos 90 % del glicerol de la mezcla, más preferiblemente al menos 95 % del glicerol de la mezcla, todavía más preferiblemente al menos 98 % del glicerol de la mezcla.

10 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* de la invención, caracterizada por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 8 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 10 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 12 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 15 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 17 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 20 % en equivalente de sacarosa.

15 La presente invención tiene particularmente por objeto la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* de la invención, caracterizada por que la proporción de glicerol en dicha mezcla está comprendida entre 8 % y 30 % en equivalente de sacarosa, con preferencia 10 % a 20 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente de 12 % a 17 % en equivalente de sacarosa.

20 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* de la invención, caracterizada por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 30 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 40 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 50 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 60 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 80 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 90 % en equivalente de sacarosa.

25 La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* de la invención, caracterizada por que la proporción de glicerol en dicha mezcla es como máximo de 95 % en equivalente de sacarosa, con preferencia como máximo 90 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente como máximo 85 % en equivalente de sacarosa.

30 La presente invención tiene particularmente por objeto la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* de la invención, caracterizada por que la proporción de glicerol en dicha mezcla está comprendida entre 30 % y 90 % en equivalente de sacarosa, con preferencia 40 % a 80 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente de 50 % a 70 % en equivalente de sacarosa.

35 La presente invención tiene por objeto la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levadura a partir de una cepa, a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* de la invención, caracterizada por que dicha cepa se selecciona entre las especies *cerevisiae*, *boulardii*, *carlsbergensis* y *uvarum*.

Se describen aquí las levaduras obtenidas por la utilización como se ha definido anteriormente de una mezcla de glicerol y de azúcar.

40 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras que comprende las etapas de:

introducción de una cepa de levadura del género *Saccharomyces* según la invención en un fermentador, y

45 multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.

La mezcla de glicerol y de azúcar es como se ha definido anteriormente.

El medio de cultivo es como se ha definido anteriormente.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que la multiplicación de dicha cepa se realiza según un modo semi-continuo o según un modo continuo, siendo los modos semi-continuo o continuo como se han definido anteriormente.

5 La duración del cultivo del procedimiento de producción de levaduras según la invención es preferiblemente inferior a 48 h, más preferiblemente inferior a 36 h, todavía más preferiblemente inferior a 24 horas.

De manera ventajosa, la duración del cultivo del procedimiento de producción de levaduras según la invención está comprendida entre 10 h y 24 h.

La duración de la producción es por ejemplo de 22 h.

10 El pH se ajusta con preferencia a un valor comprendido entre 4 y 6,5, por ejemplo, mediante la adición simultánea de ácidos o de bases.

La temperatura se ajusta con preferencia a un valor comprendido entre 30 °C y 34 °C, por ejemplo, por calentamiento o enfriamiento del fermentador.

De manera ventajosa, el procedimiento de producción de levaduras según la invención da rendimientos similares a los obtenidos con las cepas de levadura estándar producidos en ausencia de glicerol.

15 Por ejemplo, el rendimiento de producción de levaduras según la invención es superior a 85 %, con preferencia superior a 90 %, más preferiblemente superior a 95 % del rendimiento de una cepa estándar producido en ausencia de glicerol.

Como cepa estándar se puede citar, por ejemplo, la levadura de panadería depositada en la NCYC con el número NCYC 995.

20 Por "rendimiento" se designa la relación de la masa de levadura producida sobre la masa de equivalente de sacarosa procesada.

La masa de equivalente de sacarosa procesada está constituida por la masa de equivalente de sacarosa consumida y la no consumida.

25 Las levaduras obtenidas por cultivo de cepas según la invención en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar y/o las levaduras obtenidas según el procedimiento de producción de levadura de la invención tienen cualidades similares a las levaduras utilizadas clásicamente y producidas sobre un sustrato carbonado de tipo azúcar (en ausencia de glicerol).

Por el término "cualidad" se designa a la vez la cualidad funcional y las cualidades de conservación.

30 Por ejemplo, las levaduras mencionadas tienen, en cuanto a resistencia a la desecación, en cuanto a rendimiento de producción, en cuanto a poder fermentativo para las levaduras de panificación, en cuanto a producción de alcohol y/o resistencia a las altas concentraciones de alcohol para las levaduras de alcohol, cualidades similares a las levaduras convencionalmente utilizadas y producidas sobre un sustrato carbonado de tipo azúcar (en ausencia de glicerol).

35 Las levaduras obtenidas por cultivo de cepas según la invención en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar y/o las levaduras obtenidas según el procedimiento de producción de levadura de la invención tienen una concentración intracelular de glicerol con preferencia inferior a 1,5 % en masa de materia seca, más preferiblemente inferior a 1 %.

Esta baja concentración de glicerol intracelular refleja la ausencia de acumulación de glicerol en el medio, y por lo tanto el hecho de que se ha metabolizado.

40 En un modo de realización particular, el medio de cultivo comprende otra fuente de carbono asimilable por la cepa de levadura. Otra fuente de carbono asimilable por la cepa de levadura es, por ejemplo, el etanol. En tal modo de realización, la mezcla de glicerol y de azúcar constituye al menos 70 % de la fuente de carbono para la levadura, con preferencia al menos 80 % de la fuente de carbono para la levadura, más preferiblemente al menos 90 % de la fuente de carbono para la levadura.

45 En un modo de realización preferido, la totalidad del medio de cultivo no se pone en presencia de la cepa de levadura desde el principio del cultivo. El medio de cultivo se pone con preferencia en presencia de la cepa de levadura de manera escalonada en el tiempo, a un caudal constante o variable, pudiendo ser añadidos los diferentes constituyentes del medio de cultivo al mismo tiempo o por separado.

En un modo de realización preferido según la invención, se introduce la mezcla de glicerol y de azúcar en el medio de cultivo de manera escalonada en el tiempo.

En un modo de realización preferido según la invención, se introduce la mezcla de glicerol y de azúcar en el medio de cultivo de manera separada de los otros constituyentes del medio de cultivo.

- 5 La mezcla de glicerol y de azúcar se puede preparar antes de su introducción en el medio de cultivo y/o se puede formar en el medio de cultivo cuando el glicerol y el azúcar se aportan por separado.

En un modo de realización preferido según la invención, la cepa no se pone en cultivo en presencia de la totalidad del glicerol y/o de la totalidad del azúcar de la mezcla desde el principio del cultivo.

- 10 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de producción de levadura como se ha definido anteriormente, que comprende las etapas de:

- introducción de una cepa de levadura del género *Saccharomyces* según la invención en un fermentador,
- eventualmente multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que no contiene glicerol,
- 15 - multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas, según un modo semi-continuo o continuo, en un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa,
- eventualmente multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que no contiene glicerol.

- 20 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de producción de levaduras que comprende las etapas de:

- introducción de una cepa de levadura del género *Saccharomyces* según la invención en un fermentador,
- eventualmente multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que no contiene glicerol,
- 25 - multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa,
- eventualmente, multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que no contiene glicerol, y

- 30 - separación por centrifugación de la levadura de panadería así producida de su medio de cultivo, con la obtención una "crema de levadura" líquida que contiene aproximadamente entre 14 y 25 % de materias secas, incluso materias secas más elevadas si la crema de levadura se mezcla con productos osmóticos.

La presente invención tiene igualmente por objeto el procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, que comprende las etapas posteriores eventuales de:

- 35 - filtración de la crema de levadura líquida así obtenida, en general, sobre un filtro rotativo a vacío, y obtención de una levadura fresca deshidratada que contiene aproximadamente 26 a 35 % de materias secas,
- amasado de dicha levadura fresca deshidratada con el fin de obtener una masa bien homogénea,
 - extrusión de la levadura así obtenida y obtención de una levadura comprimida bajo formas de panes de levadura fresca o de levadura fresca desmenuzada, comercializadas con aproximadamente 30 % de materias secas, o si la levadura está destinada a ser secada, en forma de fideos,
 - 40 - secado de una manera controlada, en una corriente de aire caliente, por ejemplo, por fluidización, de las partículas de levaduras obtenidas por extrusión, y
 - embalaje.

- 45 La presente invención tiene particularmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla es consumido por dicha cepa según la invención, con preferencia al menos 85 % del glicerol de dicha mezcla, más preferiblemente al menos

90 % del glicerol de dicha mezcla, todavía más preferiblemente al menos 95 % del glicerol de dicha mezcla, todavía más preferiblemente al menos 98 % del glicerol de dicha mezcla.

5 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 8 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 10 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 12 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 15 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 17 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 20 % en equivalente de sacarosa.

10 La presente invención tiene particularmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que la proporción de glicerol en dicha mezcla está comprendida entre 8 % y 30 % en equivalente de sacarosa, con preferencia 10 % a 20 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente de 12 % a 17 % en equivalente de sacarosa.

15 La presente invención tiene particularmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 30 % en equivalente de sacarosa.

20 La presente invención tiene más particularmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 40 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 50 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 60 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 80 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 90 % en equivalente de sacarosa.

25 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que la proporción de glicerol en dicha mezcla es como máximo de 95 % en equivalente de sacarosa, con preferencia como máximo 90 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente como máximo 85 % en equivalente de sacarosa.

La presente invención tiene particularmente por objeto un procedimiento de producción levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que la proporción de glicerol en dicha mezcla comprende de 30 % a 90 % en equivalente de sacarosa, con preferencia 40 % a 80 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente de 50 % a 70 % en equivalente de sacarosa.

30 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha cepa de levadura según la invención se selecciona entre las especies *cerevisiae*, *bouardii*, *carlsbergensis* y *uvarum*.

35 Se describe en la presente memoria un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha cepa de levadura se selecciona entre una variante natural y/o una cepa modificada genéticamente.

40 Se describe en la presente memoria un procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente, caracterizado por que dicha cepa de levadura se selecciona entre la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3886, la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3887, la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3888, la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número I-4132, la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número I-4133, la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número I-4129, la cepa presentada el 3 de Marzo de 2009 en la CNCM con el número I-4130 o la cepa depositada el 3 marzo de 2009 en la CNCM con el número I-4131, o su mezcla.

45 La presente invención tiene igualmente por objeto levaduras susceptibles de ser obtenidas por la puesta en marcha del procedimiento de producción de levaduras como se ha definido anteriormente.

En un modo de realización particular de la invención, el glicerol residual se recicla para ser utilizado en una mezcla de glicerol y de azúcar.

Según otro modo de realización, la mezcla constituida por glicerol y por azúcar puede comprender una proporción de glicerol que va hasta 99,9 % en equivalente de sacarosa, o incluso casi 100 % en equivalente de sacarosa.

50 Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla.

Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de cepas de levadura modificadas genéticamente según la invención

Materiales y métodos

El gen STL1 (YDR536w) codifica la glicerol-permeasa. Este gen ha sido amplificado a partir del ADN genómico de una levadura industrial y ha sido secuenciado.

5 La secuencia del gen STL1 amplificado, compuesto de 1710 nucleótidos, ha sido alineada con la secuencia de nucleótidos de ORF YDR536w procedente de la levadura S288c (banco SGD). La alineación ha puesto en evidencia la presencia de siete nucleótidos diferentes sobre toda la secuencia, lo que corresponde a un porcentaje de identidad de 99,6 %.

10 La traducción de la secuencia nucleotídica del gen STL1 procedente de la levadura industrial, conduce a una proteína de 570 aminoácidos. La alineación de la secuencia proteica del gen STL1 procedente de la levadura industrial con la secuencia proteica de ORF YDR536w procedente de la levadura S288c ha puesto en evidencia la presencia de 3 aminoácidos diferentes, lo que corresponde a un porcentaje de identidad de 99,5 %.

La construcción de cepas de levadura industriales modificadas genéticamente se basa en una herramienta molecular adaptada a las levaduras industriales construida por el solicitante.

15 Esta herramienta permite especialmente:

la clonación de un gen de interés, aquí el gen STL1, entre el promotor ADH1 y el terminador CYC1 de levadura, lo que permite la expresión de este gen en la levadura,

20 la presencia por una parte y por otra de la casete de expresión, de 2 fragmentos recombinogénicos (BUD5-A y BUD5-B, de 500 nucleótidos cada uno) lo que permite la inserción por recombinación homóloga de la casete en el genoma de la levadura, después de transformación, al nivel del locus BUD5 (YCR038c) situado sobre el cromosoma III,

25 la presencia del marcador de selección KANMX, flanqueado por dos sitios loxP, lo que permite la selección de clones de levaduras que tienen integrado en su genoma la casete de expresión que contiene el gen STL1; estos mismos clones se transforman a continuación con un plásmido que lleva el gen Cre que codifica una recombinasa situada bajo el control del promotor Gal1; después de inducción de la expresión de este gen mediante el cultivo en medio que contiene galactosa, la acción de la recombinasa va a inducir la pérdida del fragmento de ADN que contiene el marcador de selección KANMX.

La casete de expresión se representa en la figura 1.

Las 5 cepas de partida utilizadas son las siguientes:

- 30
- la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM con el número I-3399,
 - la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la NCYC con el número NCYC 996,
 - la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la NCYC con el número NCYC 995,
 - la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM con el número I-4072, y
 - la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la CNCM con el número I-4071.

35 Cada una de las cepas de partida se transforma con la casete de expresión. Se seleccionan los clones resistentes a la geneticina. A continuación, para cada clon seleccionado, la integración de la casete de expresión en el genoma de la levadura en el locus bonus se verifica mediante PCR. Los clones seleccionados se transforman después con un plásmido que lleva el gen Cre que codifica una recombinasa situada bajo el control del promotor Gal1. Después de inducción de la expresión de este gen Cre por cultivo en medio que contiene galactosa, la acción de la recombinasa

40 permite inducir la pérdida del fragmento de ADN que contiene el marcador de selección KANMX. Se verifica entonces la pérdida de dicho marcador de selección KANMX a nivel del sitio de integración en el cromosoma por PCR, la presencia de la casete de expresión que contiene el gen STL1 en el genoma de la levadura en el locus bonus por PCR, así como la pérdida de la resistencia a la geneticina. La pérdida del plásmido Cre se verifica por la pérdida de la resistencia a la nurseotricina.

45 Finalmente, la transcripción del gen STL1 en presencia de azúcar en la cepa modificada genéticamente se verifica midiendo la tasa de ARNm resultante de la transcripción del gen STL1 situado bajo el control del promotor ADH1. A este efecto, la cepa modificada se cultiva en presencia de azúcar (medio de cultivo de laboratorio YPG que contiene 2 % de glucosa). El ARNm se extrae de dichas cepas y la tasa de ARNm correspondiente a la transcripción del gen

STL1 se mide por PCR cuantitativa. La tasa de ARNm de la cepa mutada se expresa entonces en función de la tasa de ARNm de la cepa no mutada correspondiente (fijada en 1).

Resultados

5 Las cepas modificadas genéticamente para expresar el gen STL1 así obtenidas han sido depositadas en la CNCM con los siguientes números:

- la cepa número I-3886, procedente de la cepa de partida depositada en la CNCM con el número I-3399,
- la cepa número I-3887, procedente de la cepa de partida depositada en la NCYC con el número NCYC 996,
- la cepa número I-3888, procedente de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la NCYC con el número NCYC 995,
- 10 - la cepa número I-4132, procedente de la cepa de partida depositada en la CNCM con el número I-4072, y
- la cepa número I-4133, procedente de la cepa de partida depositada en la CNCM con el número I-4071.

15 Las tasas de transcripción indicadas en la figura 2 indican un fuerte aumento (de 270 a 300 veces) de la transcripción del gen STL1 en las tres cepas modificadas genéticamente I-3886, I-3887 y I-3888 cultivadas en presencia de azúcar, en comparación con el nivel de transcripción del gen en la cepa testigo no mutada correspondiente, cultivada en el mismo medio.

En cuanto a las tasas de transcripción de las cepas I-4132 y I-4133 cultivadas en presencia de azúcar, se pone también en evidencia un fuerte aumento (superior a 200 veces) de la transcripción del gen STL1, en comparación con el nivel de transcripción del gen en la cepa testigo no mutada correspondiente, cultivada en el mismo medio.

20 Ejemplo 2: Producción de levaduras a partir de cepas modificadas genéticamente sobre una mezcla de glicerol y de azúcar

Materiales y métodos

(i) Modo semi-continuo

La producción de levadura fresca se lleva a cabo de la manera descrita en el libro "Yeast technology", segunda edición, 1991, G. Reed et Nagodawithana T.W. publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

25 El fermentador utilizado se siembra con un cierto volumen inicial que contiene agua, un poco de nitrógeno y de fósforo, elementos nutritivos tales como vitaminas y minerales.

30 Antes de sembrar el fermentador con una cierta cantidad de cepas de levadura vivas, se añade un poco de melaza para iniciar el cultivo. El pH y la temperatura se ajustan a valores comprendidos respectivamente de 3,5 a 7 para el pH (con aportes simultáneos de ácido o de base según sea necesario), y de 30 a 34 °C para la temperatura (con una calefacción o enfriamiento del fermentador según sea necesario). El cultivo en modo semi-continuo denominado de lote alimentado (fed-batch) se inicia por adición de melaza o de una mezcla de melaza y de glicerol que comprende una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa. La velocidad de colada de la melaza o de la mezcla de glicerol y de melaza determina la velocidad de crecimiento de las levaduras. Esta velocidad de colada variable se fija a lo largo del tiempo de manera que el equivalente de sacarosa aportado con el tiempo pueda ser totalmente respirado (oxidado) por la levadura. En tales condiciones, la producción de etanol por la levadura a lo largo del tiempo es nula o se limita a las primeras horas del ensayo. Con el fin de respetar estas condiciones, el cultivo se realiza, por ejemplo, a una tasa media de crecimiento de $0,16 \text{ h}^{-1}$ para las cepas I-3886, I-3887, I-3888 y las cepas no modificadas genéticamente correspondientes, y a una tasa media de crecimiento de $0,13 \text{ h}^{-1}$ para las cepas I-4132 y I-4133 y las cepas no modificadas genéticamente correspondientes.

40 El medio se airea y se mezcla suficientemente para no ser limitante de oxígeno.

Como complemento de la melaza o de la mezcla de glicerol y de melaza, una fuente continua de nitrógeno en la forma de urea y el fósforo en la forma de ácido fosfórico permite responder a las necesidades de la levadura para la síntesis de las proteínas y otros componentes celulares.

45 El aporte de melaza o de la mezcla de glicerol y de melaza se mantiene durante 22 horas a fin de obtener la cantidad deseada de levadura, teniendo en cuenta el equipo utilizado.

A lo largo de las últimas horas de cultivo, el aporte de melaza o de la mezcla de glicerol y melaza se disminuye progresivamente con el fin de reducir la tasa de levaduras que brotan en el fermentador.

- Según este procedimiento de realización, la alimentación en sustrato carbonado (por ejemplo, la mezcla de glicerol y de melaza que comprende una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de azúcar) permite multiplicar la biomasa inicial por 40 en 22 h de cultivo, mientras mantiene un metabolismo mayoritariamente respiratorio y se garantiza una tasa de brotes en la recolección inferior a 5-10 %. La cantidad total de sustrato carbonado colado es función de la capacidad de transferencia de oxígeno y calorías de la cuba de fermentación.
- 5 La concentración de biomasa final está comprendida entre 5 y 7 % y el contenido en nitrógeno de esta biomasa entre 6 y 9 %.
- Durante el cultivo y al final del cultivo, la cantidad de glicerol en el medio de cultivo se mide por HPLC y se compara con la cantidad de glicerol aportado.
- 10 Al final del cultivo, la levadura se recoge por centrifugación y se mide la masa de levadura recogida.
- La levadura producida (en g de MS) es la diferencia entre la levadura recogida (en g de MS) y la levadura del inóculo (en g de MS) (MS significa materia seca).
- El rendimiento en porcentaje se obtiene entonces haciendo la relación "levadura producida (g de MS)"/"sustrato carbonado introducido en equivalente de sacarosa (g)" y multiplicando por 100.
- 15 El porcentaje de glicerol consumido se calcula haciendo la relación "cantidad de glicerol medido al final del cultivo (g)"/"cantidad de glicerol aportado durante el cultivo (g)" y multiplicando por 100.
- (ii) Modo de realización en quimiostato
- El fermentador se alimenta de una fuente de carbono constituida por una mezcla de glicerol y de azúcar, una fuente de nitrógeno, una fuente de azufre y una fuente de fósforo. Las vitaminas y los minerales se aportan en exceso.
- 20 Se ensayan las mezclas de glicerol y de glucosa que tienen de 0 % a 80 % de glicerol en equivalente de sacarosa.
- El fermentador se pone sobre una balanza que controla una bomba de trasiego a fin de mantener constante el volumen en el fermentador mediante el control de su peso. El cultivo está limitado por el sustrato carbonado (glucosa y glicerol), siendo aportados los otros constituyentes en exceso. El medio se airea suficientemente y se mezcla para no ser nunca limitante de oxígeno.
- 25 El medio se añade en continuo con un caudal constante que permite obtener una tasa de dilución (= caudal/volumen) de $0,15 \text{ h}^{-1}$ y por lo tanto en estado estacionario una tasa de crecimiento constante de $0,15 \text{ h}^{-1}$.
- La concentración en equivalente de sacarosa en el medio de alimentación es igual a 19 g/kg.
- El rendimiento, así como la cantidad residual de glicerol se miden en el cultivo en estado estacionario.
- 30 El estado estacionario se alcanza cuando las concentraciones en el fermentador son estables durante al menos 3 tiempo de residencia, siendo el tiempo de residencia la relación $1/[\text{tasa de dilución}]$.
- El rendimiento de producción de biomasa sobre azúcar colado es la relación de la biomasa producida sobre el azúcar colado. En estado estacionario, la biomasa producida por unidad de tiempo es igual al caudal de trasiego multiplicado por la concentración de biomasa en el fermentador (determinada filtrando un volumen conocido de malta de levadura y pesando el pastel de levadura previamente lavado y secado).
- 35 En el momento de la determinación del rendimiento se toma una muestra de malta de levadura e inmediatamente se filtra para eliminar la biomasa. Se analiza el filtrado por HPLC para valorar la cantidad residual de glicerol.
- Resultados
- (i) Modo semi-continuo
- 40 Las cepas no mutadas I-3399, NCYC 996, NCYC 995, I-4072 y I-4071 y las correspondientes cepas mutadas, I-3886, I-3887, I-3888, I-4132 y I-4133 respectivamente, han sido producidas según el esquema de realización descrito anteriormente, utilizando como fuente de carbono la melaza pura o una mezcla de glicerol y de melaza que comprende una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa.
- Las figuras 3 y 4 y las tablas 1, 2, 3, 4 y 5 ilustran los resultados obtenidos con las cepas no mutadas y las correspondientes cepas mutadas.

El rendimiento de producción se determina para cada cepa no mutada en presencia de melaza pura (sin glicerol). En las tablas 1, 2, 3, 4 y 5, los valores indicados en la fila de "rendimiento" corresponden al rendimiento en porcentaje con respecto al rendimiento de la cepa no mutada producida sobre melaza pura.

5 La tabla 1 indica los resultados de los ensayos realizados con la cepa NCYC 996 no mutada y la correspondiente cepa mutada I-3887.

La tabla 2 indica los resultados de los ensayos realizados con la cepa I-3399 no mutada y la correspondiente cepa mutada I-3886.

La tabla 3 indica los resultados de los ensayos realizados con la cepa NCYC 995 no mutada y la correspondiente cepa mutada I-3888.

10 La tabla 4 indica los resultados de los ensayos realizados con la cepa I-4072 no mutada y la correspondiente cepa mutada I-4132.

La tabla 5 indica los resultados de los ensayos realizados con la cepa I-4071 no mutada y la correspondiente cepa mutada I-4133.

15 En la lectura de estas tablas, se constata que durante una producción sobre una mezcla de glicerol y de melaza (que comprende una proporción de glicerol de 20 % en equivalente de sacarosa) como fuente de carbono, el rendimiento de producción obtenido con las cepas no mutadas es significativamente inferior al rendimiento de producción obtenido sobre melaza pura. Esta disminución del rendimiento se asocia con la no utilización de una parte importante del equivalente de sacarosa aportado en forma de glicerol, acumulándose el glicerol en el medio de cultivo como se indica en los resultados en la fila "glicerol aportado consumido".

20 En estas mismas tablas se indican los resultados de los ensayos realizados con las cepas mutadas, cuando la fuente de carbono aportada es una mezcla de melaza y de glicerol. Las medidas efectuadas indican que el consumo del glicerol aportado es prácticamente total para las tres cepas mutadas I-3887, I-3886 y I-3888 (consumo de glicerol superior al 99 %), lo que se traduce en rendimientos de producción al menos equivalentes a los obtenidos con las cepas no mutadas producidas sobre melaza pura (tablas 1 a 3).

25 Con respecto a las cepas mutadas I-4132 y I-4133, el consumo del glicerol aportado es superior al 80 % y el rendimiento es superior a 90 % del rendimiento obtenido con la cepa no modificada genéticamente en ausencia de glicerol (tablas 4 y 5).

30 Esta diferencia de consumo del glicerol por las cepas no mutadas y las correspondientes cepas mutadas se ilustra en las figuras 3 y 4 que presentan la acumulación de glicerol a lo largo del tiempo durante los ensayos de producción sobre una mezcla de glicerol y de melaza que comprende una proporción de 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa.

La curva con triángulos de la figura 3 representa la cantidad residual de glicerol en el medio libre de levaduras durante el cultivo de la cepa no mutada NCYC 996 y la curva con cuadrados la de la cepa mutada I-3887.

35 La curva con triángulos de la figura 4 representa la cantidad residual de glicerol en el medio libre de levaduras durante el cultivo de la cepa no mutada NCYC 995 y la curva con cuadrados la de la cepa mutada I-3888.

40 La diferencia de consumo entre las cepas no mutadas y las correspondientes cepas mutadas son significativas después de las cinco primeras horas de cultivo. Durante las cinco primeras horas de cultivo, la capacidad respiratoria de las cepas no mutadas y de las cepas mutadas se satura por el azúcar aportado (efecto "Crabtree"), y este fenómeno va acompañado de una producción de etanol. Cuando este fenómeno desaparece, es decir, cuando las levaduras tienen la capacidad respiratoria de oxidar la totalidad del azúcar y del glicerol aportado, las cepas mutadas consumen la casi totalidad del glicerol colado simultáneamente con el azúcar, mientras que las cepas no mutadas acumulan el glicerol.

45

Tabla 1

	0 % de glicerol	20 % de glicerol	
	NCYC 996	NCYC 996	I-3887
Rendimiento (en porcentaje del rendimiento de la cepa testigo en ausencia de glicerol)	100,0	89,6	102,5
Glicerol aportado consumido (en %)	/	65,5	99,2

Tabla 2

	0 % de glicerol	20 % de glicerol	
	I-3399	I-3399	I-3886
Rendimiento (en porcentaje del rendimiento de la cepa testigo en ausencia de glicerol)	100,0	93,8	108,1
Glicerol aportado consumido (en %)	/	48,9	99,1

5 Tabla 3

	0 % de glicerol	20 % de glicerol	
	NCYC 995	NCYC 995	I-3888
Rendimiento (en porcentaje del rendimiento de la cepa testigo en ausencia de glicerol)	100,0	93,7	100,9
Glicerol aportado consumido (en %)	/	57,9	98,9

Tabla 4

	0 % de glicerol	20 % de glicerol	
	I-4072	I-4072	I-4132
Rendimiento (en porcentaje del rendimiento de la cepa testigo en ausencia de glicerol)	100,0	78,7	93,3
Glicerol aportado consumido (en %)	/	22,7	83,9

Tabla 5

	0 % de glicerol	20 % de glicerol	
	I-4071	I-4071	I-4133
Rendimiento (en porcentaje del rendimiento de la cepa testigo en ausencia de glicerol)	100,0	88,2	92,9
Glicerol aportado consumido (en %)	/	44,8	84,2

(ii) Modo continuo

En las figuras 5 y 6, cada punto corresponde a un estado estacionario obtenido con un medio de alimentación en el cual la proporción de glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar es de 0 %, 20 %, 50 % u 80 % en equivalente de azúcar.

- 5 Con un medio de alimentación cuya única fuente de carbono es la glucosa (ausencia de glicerol), el rendimiento de producción de biomasa de la cepa mutada (CNCM I-3887) y el de la cepa no mutada (NCYC 996) son idénticos. La mutación del gen STL1 no modifica el rendimiento de producción de biomasa sobre glucosa.

- 10 La sustitución de 20 %, 50 % u 80 % de la glucosa en equivalente de sacarosa, por el glicerol en la mezcla de glicerol y de azúcar de la alimentación va acompañada, para la cepa no mutada, de una acumulación creciente de glicerol en el medio de reacción (figuras 7 y 8). Esta cantidad de glicerol que se acumula en el medio de reacción lleva consigo una disminución pronunciada del rendimiento de producción de biomasa sobre el equivalente de azúcar colado (figuras 5 y 6). Por lo tanto, a una tasa de 50 % de sustitución, el rendimiento de producción de las cepas no mutadas ha caído en más de 25 % con respecto al rendimiento de la misma cepa producida sobre un medio que no contiene más que glucosa.

- 15 El consumo de glicerol de las cepas no mutadas es inferior a 57 % a una tasa de sustitución del 20 %, inferior a 38 % a una tasa de sustitución de 50 % e inferior a 22 % a una tasa de sustitución de 80 % (figuras 7 y 8).

- 20 Al contrario, las cepas mutadas consumen la casi totalidad del glicerol colado, simultáneamente con el azúcar, como se demuestra por la muy baja concentración de glicerol residual medida en el medio de reacción. Por lo tanto, las cepas mutadas consumen más de 95 % del glicerol de la mezcla, y hasta una tasa de sustitución del 80 % (figuras 7 y 8). En consecuencia, el rendimiento de producción sobre el equivalente del azúcar colado no se ve afectado o es poco afectado por la tasa de sustitución de azúcar por glicerol. El rendimiento de producción de la cepa mutada es siempre superior al de la correspondiente cepa no mutada en presencia de una mezcla que contiene glicerol (figuras 5 y 6).

- 25 Por otra parte, en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 20 % o 50 % de glicerol en equivalente de sacarosa, el rendimiento de producción de las cepas mutadas es superior a 90 % con respecto al de la cepa no mutada cultivada en ausencia de glicerol, y es superior a 85 % en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 80 % de glicerol en equivalente de sacarosa (figuras 5 y 6).

Ejemplo 3: Obtención de variantes naturales

Materiales y Métodos

- 30 (i) Cribado directo

Una población de células de una cepa de levadura de panificación estándar se somete a una radiación UV de 1200 a 2000 J/cm² que lleva a una pérdida de viabilidad del 99,9 %.

Las variantes naturales obtenidas se aíslan en un medio no selectivo (YPG) y después se criban sobre la base de su rendimiento y de su consumo de glicerol en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar.

- 35 El cribado se realiza después del cultivo en modo semi-continuo, en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa, en fermentadores de 1 litro, y de 7 litros.

Las condiciones experimentales del cultivo semi-continuo son como se describen en el ejemplo 2 durante un período de 22 horas, con una tasa media de crecimiento de 0,16 h⁻¹.

(ii) Cribado después de enriquecimiento en quimiostato

- 40 Una población de células de la misma cepa de partida que anteriormente, se somete a tasas crecientes de radiación UV (de 400 a 4400 J/cm²) que llevan a pérdidas de viabilidad que van de 80 a 99,98 %.

Las variantes naturales sometidas a estas diferentes tasas de radiación se reagrupan a continuación y una parte se utiliza para sembrar un cultivo en quimiostato.

- 45 La fuente de carbono del cultivo está constituida por una mezcla de glicerol y de glucosa que comprende 50 % de glicerol en equivalente de sacarosa.

El cultivo se lleva a cabo hasta obtener aproximadamente 220 generaciones celulares.

El consumo de glicerol se mide a lo largo del cultivo.

Las extracciones del cultivo se realizan regularmente con vistas al cribado de las variantes naturales.

Las variantes naturales procedentes de las diferentes extracciones se aíslan sobre un medio no selectivo (YPG) y después se criban sobre la base de su rendimiento y de su consumo de glicerol en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar.

- 5 El cribado se realiza después del cultivo en modo semi-continuo, en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa, en fermentadores de 1 litro, y de 7 litros.

Las condiciones experimentales del cultivo semi-continuo son como se describen en el ejemplo 2 durante un período de 22 horas, con una tasa media de crecimiento de 0,16.

Resultados

- 10 Las variantes naturales procedentes del cribado directo o del cribado después de enriquecimiento en quimiostato presentan perfiles de consumo de glicerol y de rendimiento muy variados.

Un ejemplo de resultado obtenido sobre 53 variantes naturales procedentes del cribado después de enriquecimiento en quimiostato se presenta en la figura 9. El consumo de glicerol de la cepa de partida (T) está igualmente indicado.

- 15 Un cierto número de variantes naturales presenta un consumo de glicerol superior a 80 % en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa y un rendimiento superior o igual a 85 % de la cepa de partida.

- 20 Entre estas figuran las variantes naturales depositadas en la CNCM con los números I-4129 (variante natural nº 4), I-4130 (variante natural nº 20) y I-4131 (variante natural nº 2), que se han obtenido por cribado después del enriquecimiento en quimiostato a partir de la extracción correspondiente para la obtención de aproximadamente 145 generaciones celulares en el quimiostato.

Se hace notar que el análisis del consumo de glicerol a lo largo del cultivo en quimiostato demuestra que durante las 100 primeras generaciones, el glicerol residual disminuye regularmente, lo que da a entender una adaptación del cultivo a la mezcla de glicerol y de azúcar.

- 25 Por otra parte, la tasa de ARNm correspondiente a la transcripción del gen STL1 se mide por RT-PCR cuantitativa, como se indica en el ejemplo 1, sobre diferentes variantes naturales. La tasa de ARNm obtenida se compara entonces con la de la cepa de partida que no ha sido sometida a tratamiento UV.

Según las variantes naturales, se observa una tasa de ARNm similar a la de la cepa de partida o multiplicada por un factor 2 hasta un factor 7.

- 30 La capacidad de las cepas para consumir glicerol en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar no está por tanto necesariamente relacionada con la sobreexpresión del gen STL1.

Ejemplo 4: Producción de levaduras a partir de variantes naturales sobre una mezcla de glicerol y de azúcar

Materiales y métodos

Los cultivos en modo semi-continuo se realizan como en el ejemplo 2, durante un período de 22 h, con una tasa media de crecimiento de $0,16 \text{ h}^{-1}$.

- 35 Resultados

Las variantes naturales I-4129, I-4130, y I-4131, así como la cepa de levadura de partida de la que proceden, se producen según el esquema de realización descrito anteriormente, utilizando como fuente de carbono la melaza pura o una mezcla de glicerol y de melaza que comprende una proporción de glicerol de 20 % o 40 % en equivalente de sacarosa.

- 40 El rendimiento de producción se determina para la cepa de partida en presencia de melaza pura (sin glicerol). En las tablas 6 y 7, los valores indicados en la fila de "rendimiento" corresponden al rendimiento en porcentaje con respecto al rendimiento de la cepa de partida producida sobre melaza pura.

Las tablas 6 y 7 indican los resultados de los ensayos realizados con las variantes naturales y la cepa de partida (T) en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende respectivamente 20 % y 40 % de glicerol.

- 45 Tabla 6

	0 % de glicerol	20 % de glicerol			
	T	T	I-4129	I-4130	I-4131
Rendimiento (en porcentaje del rendimiento de la cepa testigo en ausencia de glicerol)	100,0	86,5	98,9	100,3	100,6
Glicerol aportado consumido (en %)	/	38,5	99,6	99,6	99,5

Tabla 7

	0 % de glicerol	40 % de glicerol		
	T	I-4129	I-4130	I-4131
Rendimiento (en porcentaje del rendimiento de la cepa testigo en ausencia de glicerol)	100,0	99,7	88,2	93,5
Glicerol aportado consumido (en %)	/	99,1	85,6	93,1

5 Las medidas efectuadas indican que el consumo del glicerol aportado es prácticamente total para las tres variantes naturales en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 20 % de glicerol en equivalente de sacarosa (consumo de glicerol superior a 99 %), mientras que el consumo de la cepa de partida es inferior a 40 % (tabla 6).

10 En presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar que comprende 40 % de glicerol en equivalente de sacarosa, las medidas efectuadas indican que el consumo del glicerol aportado es prácticamente total para la variante natural I-4129, superior a 85 % para la variante natural I-4130 y superior a 90 % para la variante I-4131.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Saccharomyces*, caracterizada por que en presencia de un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, en condiciones aeróbicas, consume al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla mientras consume el azúcar simultáneamente. comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 20 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa, siendo la cepa de *Saccharomyces* una cepa modificada genéticamente para sobreexpresar el gen STL1 en presencia de azúcar o siendo seleccionada entre la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4129, la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4130 y la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4131
2. La cepa según la reivindicación 1, caracterizada por que consume al menos 85 % del glicerol de la mezcla, con preferencia al menos 90 % del glicerol de la mezcla, más preferiblemente al menos 95 % del glicerol de la mezcla, todavía más preferiblemente al menos 98 % del glicerol de la mezcla.
3. La cepa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 30 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 40 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 50 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 60 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 80 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 90 % en equivalente de sacarosa.
4. La cepa según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que se selecciona entre las especies *cerevisiae*, *bouardii*, *carlsbergensis* y *uvarum*.
5. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que se selecciona de la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3886, la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3887, la cepa depositada el 20 de diciembre de 2007 en la CNCM con el número CNCM I-3888, la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4132 y la cepa depositada el 3 de marzo de 2009 en la CNCM con el número CNCM I-4133.
6. Utilización de una cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la producción de levaduras en presencia de una mezcla de glicerol y de azúcar, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.
7. Utilización de una mezcla de glicerol y de azúcar para la producción de levaduras a partir de al menos una cepa de *Saccharomyces* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.
8. Procedimiento de producción de levaduras que comprende las etapas de:
- introducción de una cepa de *Saccharomyces* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un fermentador, y
- multiplicación de dicha cepa en condiciones aeróbicas según un modo semi-continuo o según un modo continuo en un medio de cultivo que comprende una mezcla de glicerol y de azúcar, comprendiendo dicha mezcla una proporción de glicerol de al menos 5 % en equivalente de sacarosa, siendo la suma de las proporciones de glicerol y de azúcar de dicha mezcla igual a 100 % en equivalente de sacarosa.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que al menos 80 % del glicerol de dicha mezcla es consumido por dicha cepa simultáneamente al consumo de azúcar, con preferencia al menos 85 % del glicerol de dicha mezcla, más preferiblemente al menos 90 % del glicerol de dicha mezcla, todavía más preferiblemente al menos 95 % del glicerol de dicha mezcla, todavía más preferiblemente al menos 98 % del glicerol de dicha mezcla.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 8 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 10 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 12 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 15 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 17 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 20 % en equivalente de sacarosa.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 30 % en equivalente de sacarosa.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado por que dicha mezcla comprende una proporción de glicerol de al menos 40 % en equivalente de sacarosa, con preferencia al menos 50 % en equivalente de sacarosa, más preferiblemente al menos 60 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 70 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 80 % en equivalente de sacarosa, todavía más preferiblemente al menos 90 % en equivalente de sacarosa.
- 5

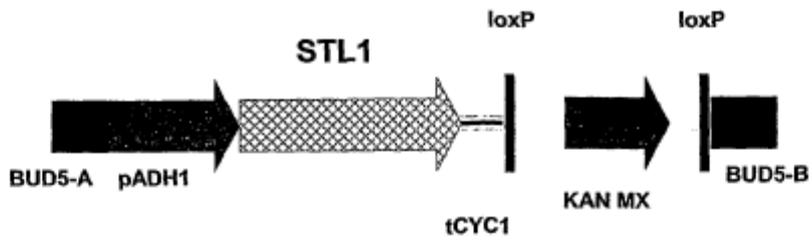


Figura 1

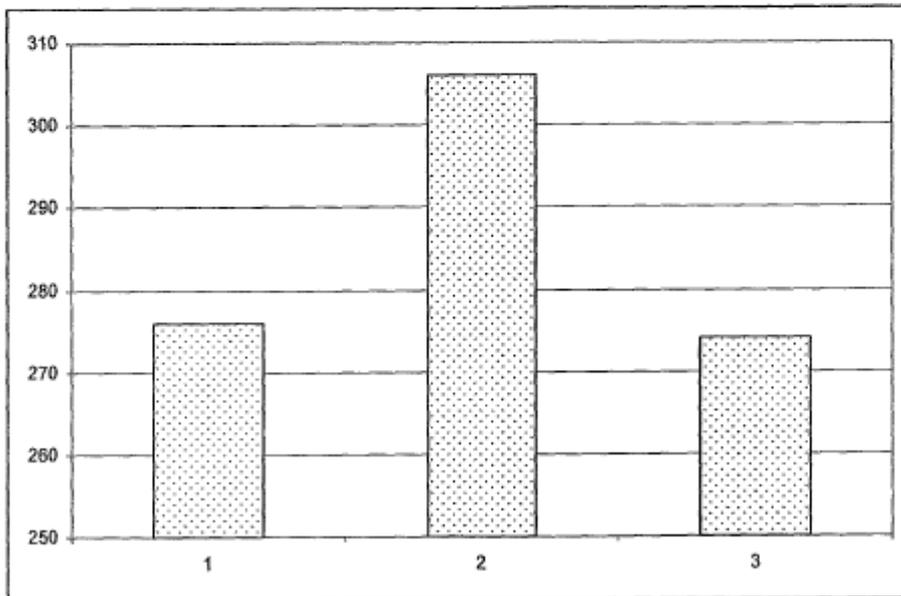


Figura 2

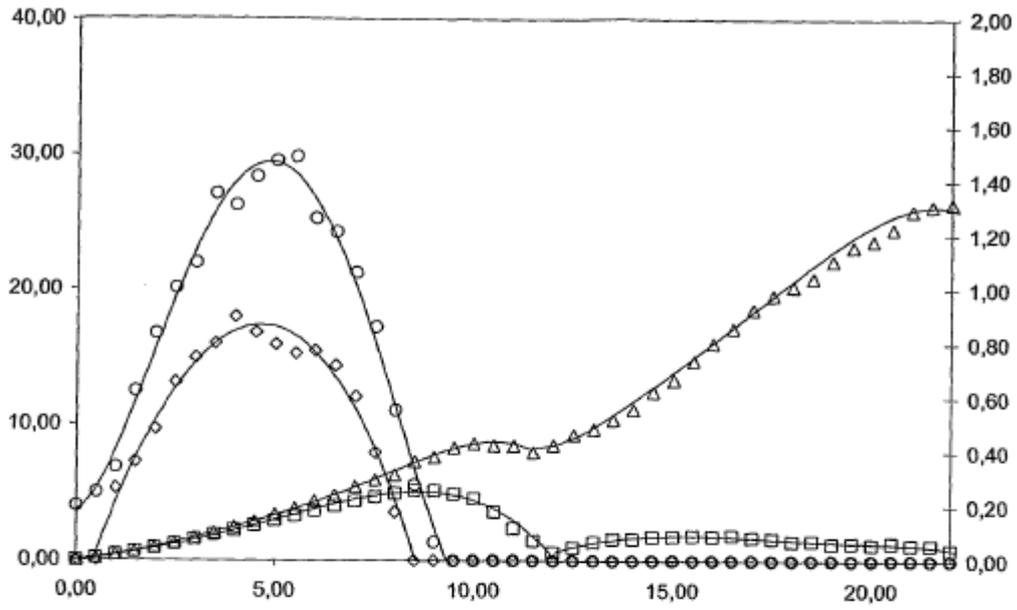


Figura 3

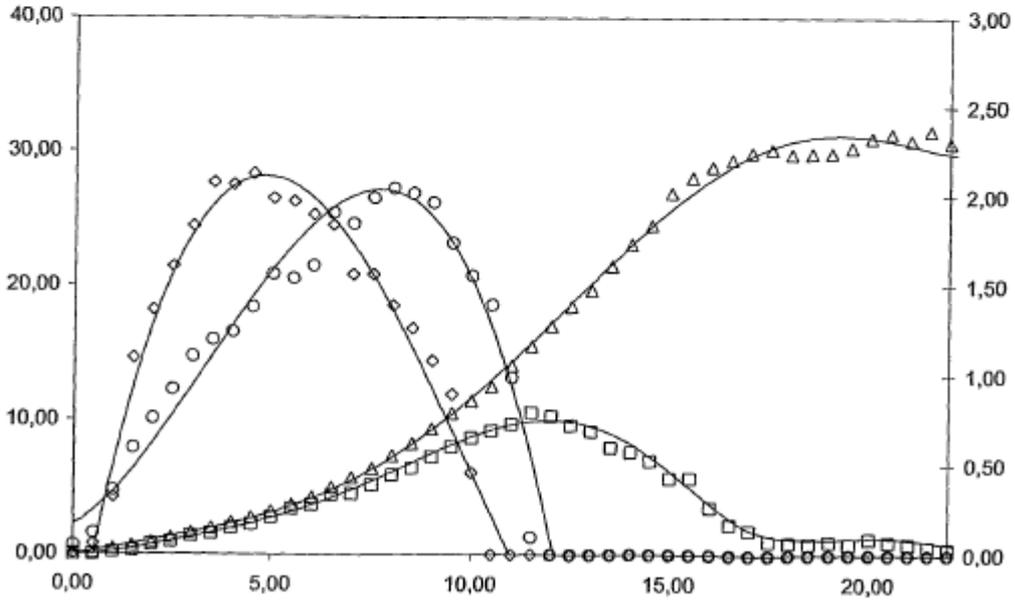


Figura 4

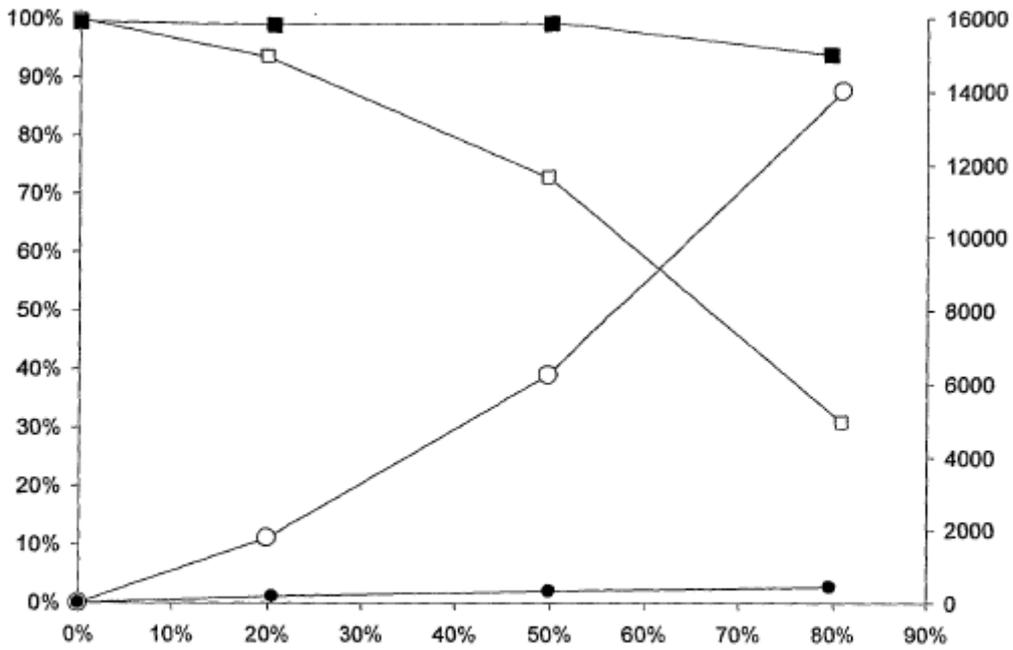


Figura 5

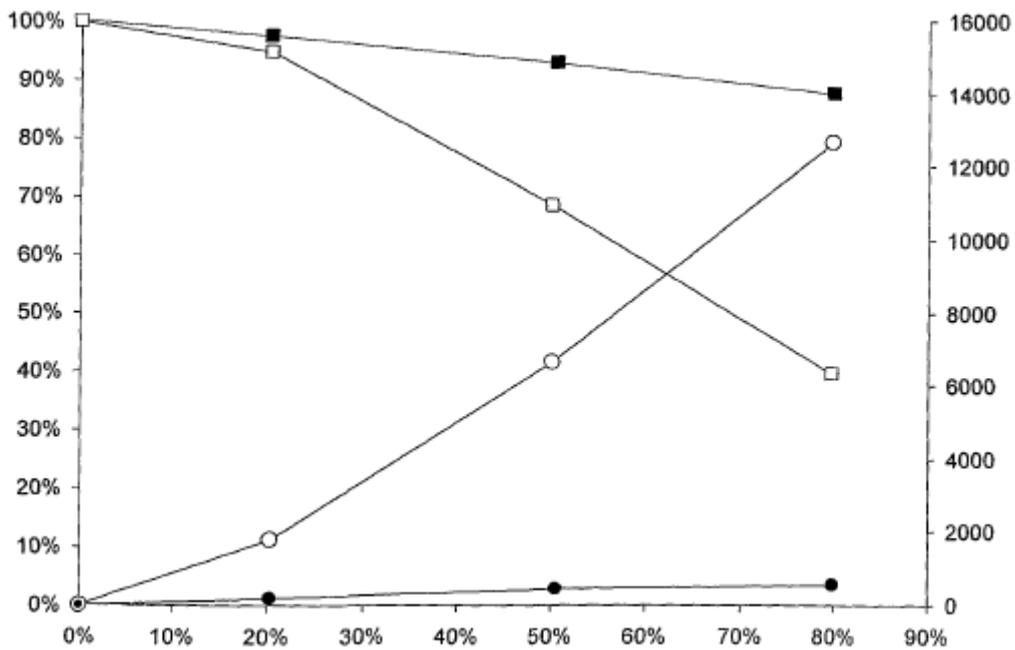


Figura 6

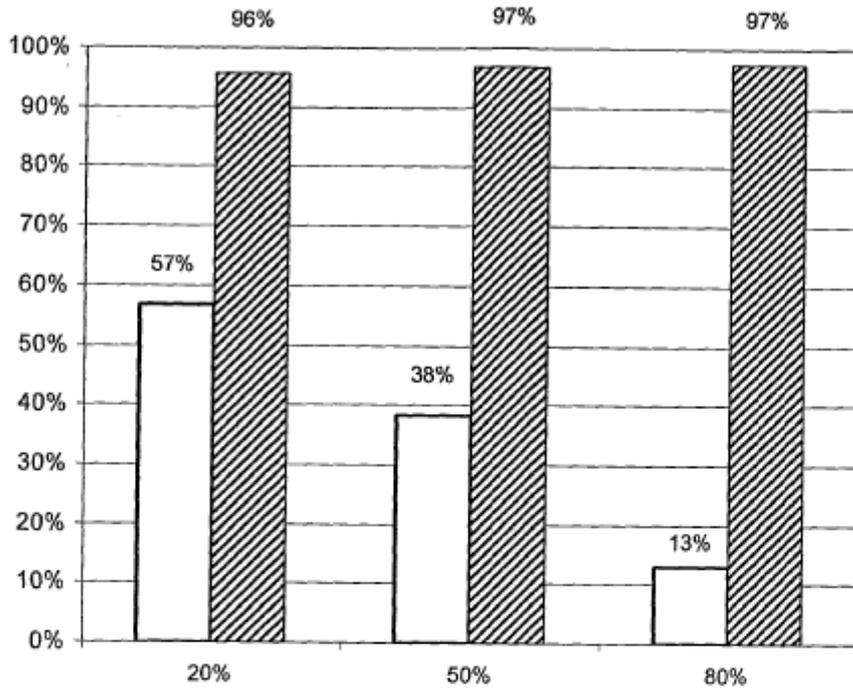


Figura 7

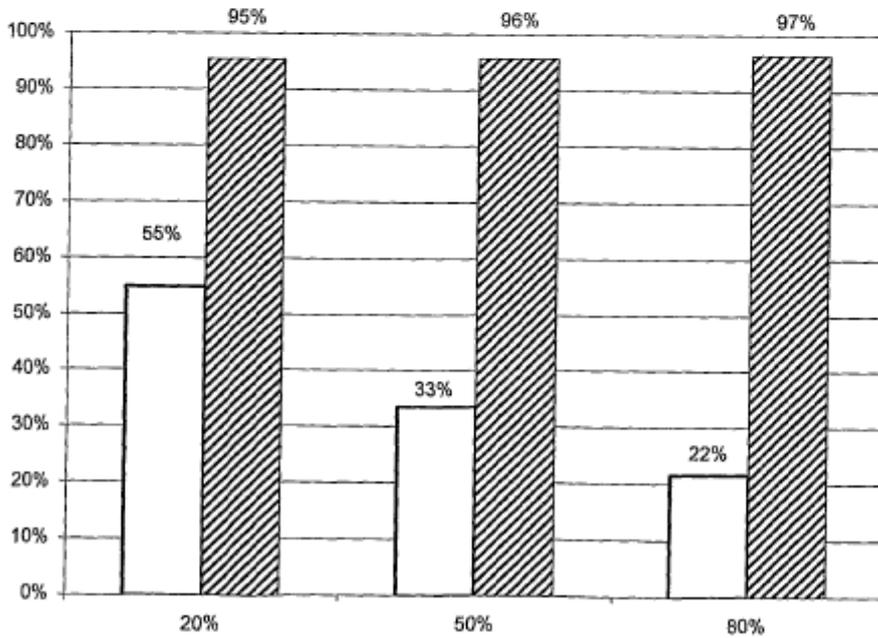


Figura 8

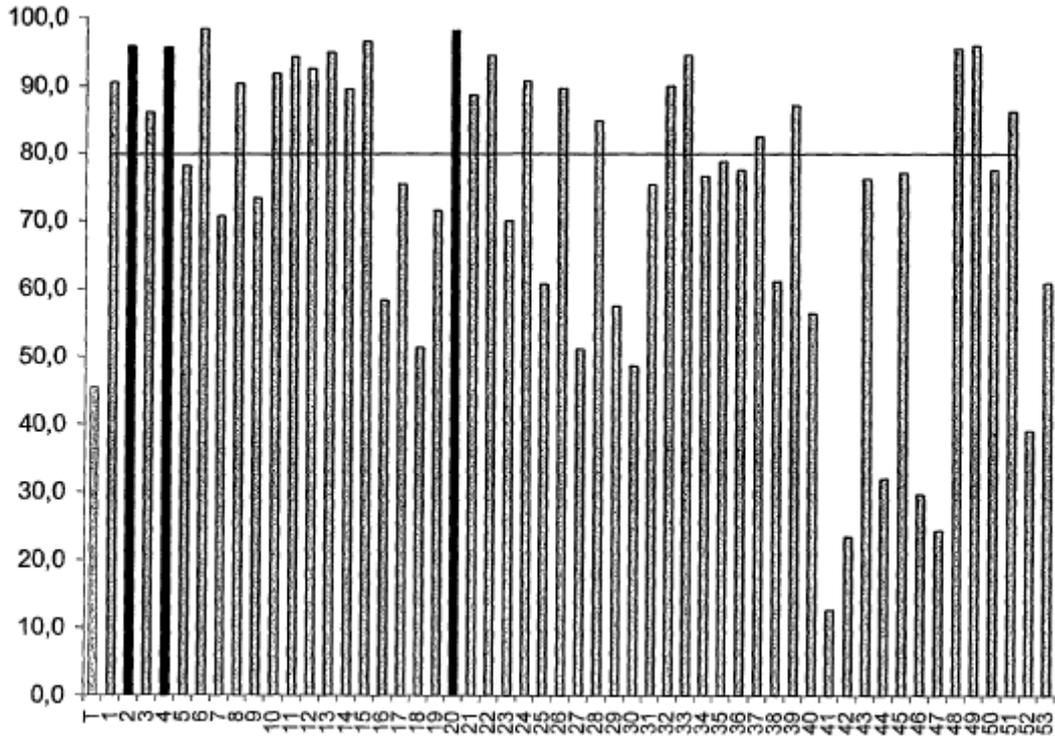


Figura 9