



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 007 622**

⑮ Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
C12P 1/02 (2006.01)
C12G 1/022 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015** PCT/EP2015/051995

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015** WO15114115

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015** E 15702250 (0)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025** EP 3099780

④ Título: **Método para obtener cepas de levadura de baja producción de etanol, cepas de levadura obtenidas a partir del mismo y su uso**

⑩ Prioridad:

31.01.2014 EP 14290019

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2025

⑦ Titular/es:

DANSTAR FERMENT AG (50.00%)
Poststrasse 30
6300 Zug, CH y
INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (50.00%)

⑦ Inventor/es:

TILLOY, VALENTIN;
ORTIZ-JULIEN, ANNE;
NOBLE, JESSICA y
DEQUIN, SYLVIE

⑦ Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 007 622 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para obtener cepas de levadura de baja producción de etanol, cepas de levadura obtenidas a partir del mismo y su uso

5 **Campo tecnológico**

La presente divulgación se refiere a un proceso para obtener cepas de levadura variantes no modificadas genéticamente que tienen la capacidad de producir menos etanol que sus correspondientes cepas ancestrales/progenitoras, así como cepas de levadura variantes obtenidas o derivadas de este proceso. La presente divulgación también se refiere al uso de dicha cepa de levadura variante durante un proceso de fermentación alcohólica, tal como la producción de vino.

Antecedentes

15 Durante los pasados veinte años, la graduación alcohólica del vino ha aumentado considerablemente, en aproximadamente un 2 % (v/v), como resultado al alto contenido en azúcar de las uvas usadas actualmente. Esto se debe principalmente a la evolución de las prácticas enológicas, favoreciéndose la recolección de uvas muy maduras para adaptarse a la demanda de los consumidores de un vino rico en sabor a fruta madura. Esta tendencia plantea graves problemas a la industria vitivinícola. El mercado se orienta actualmente hacia las bebidas con contenido moderado de alcohol, en línea con las políticas públicas de prevención, los problemas de salud y las preferencias de los consumidores. Además, ya que algunos países imponen tasas sobre el contenido de alcohol, esta tendencia plantea problemas económicos. Los altos niveles de alcohol pueden alterar la calidad sensorial de los vinos, aumentando la percepción de calor y, en menor medida, disminuyendo la percepción de dulzor, acidez y aroma.

20 25 También, los altos niveles de etanol generados durante la fermentación pueden inhibir la actividad de la levadura y provocar fermentaciones lentas o atascadas. En consecuencia, la reducción del contenido de etanol del vino ha sido uno de los principales focos de la investigación vitivinícola, en las distintas fases del proceso de elaboración del vino. Se están desarrollando varias estrategias vitivinícolas para disminuir la acumulación de azúcar en las uvas. Estos enfoques incluyen la selección de variedades de uva adecuadas que acumulen menos azúcar y la modificación de las

30 35 técnicas de cultivo para reducir la acumulación de azúcar en las bayas, tales como riego, gestión del dosel o limitación de la fotosíntesis. Las técnicas físicas de desalcoholización, por ejemplo, ósmosis inversa, nanofiltración o destilación también se han desarrollado y están disponibles a corto plazo. Sin embargo, los tratamientos de desalcoholización son costosos de aplicar y pueden tener efectos perjudiciales en la calidad organoléptica del vino.

40 45 Una opción atractiva y económica sería usar levaduras que produzcan menos alcohol a partir de la misma cantidad de azúcar. De hecho, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar cepas de levadura vírica modificadas con un rendimiento reducido de etanol. Uno de los enfoques más eficaces consistió en desviar el metabolismo hacia una mayor producción de glicerol y, por lo tanto, lejos del etanol. En *Saccharomyces cerevisiae*, el glicerol desempeña un papel importante en la homeostasis redox y en la resistencia al estrés osmótico: es el principal soluto compatible de la levadura. El glicerol se encuentra en los vinos en concentraciones en el intervalo de 5 a 9 g/l y contribuye positivamente a la calidad del vino aportándole cuerpo y dulzor. También puede conferir viscosidad a concentraciones muy elevadas (superiores a 25 g/l), como en los vinos *Botrytis*. El redireccionamiento del carbono hacia el glicerol provocó una disminución sustancial de la producción de etanol y la acumulación de diversos compuestos, incluyendo acetato y acetona, ambos no deseables para la calidad sensorial del vino. La ingeniería racional de las reacciones clave en el punto de ramificación del acetaldehído permitió limitar la acumulación de estos compuestos no deseables. De este modo, se obtuvieron cepas de bajo contenido alcohólico en las cuales el flujo de carbono se reorientó hacia el glicerol y el 2,3-butanodiol, un poliol sin impacto sensorial en los vinos. Estas levaduras del vino modificadas pueden reducir el contenido de alcohol del vino en un 1 a un 3 % (v/v). Sin embargo, la escasa aceptación por parte de los consumidores de la tecnología recombinante del ADN en los alimentos es un obstáculo importante para su comercialización. En consecuencia, hay un gran interés por usar enfoques alternativos de organismos no modificados genéticamente (OMG) para perfeccionar las propiedades de las cepas de levadura vírica.

55 Sería muy deseable disponer de cepas de levadura variantes no modificadas genéticamente capaces de producir menos etanol que sus correspondientes cepas de levadura ancestrales. Preferentemente, la fermentación alcohólica de estas cepas de levadura variantes no da lugar a la producción de propiedades organolépticas no deseables en el producto fermentado.

60 Petrovska *et al.*, 1999 (Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Canadian journal of microbiology*, 45(8), pp.695-699) se refieren a la producción de glicerol por levaduras sometidas a estrés osmótico y por sulfitos.

Kutyna *et al.*, 2010 (Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends in Food Science & Technology*, 21(6), pp.293-302) revisa los enfoques de base biológica que influyen en el rendimiento de etanol durante la fermentación.

65 Kutyna, 2008 (Isolation of low ethanol producing yeast strains using adaptive evolution. Tesis doctoral, Victoria

University) se refiere a la aplicación de la evolución adaptativa para generar variantes de *Saccharomyces cerevisiae* que producen niveles reducidos de etanol en relación con las cepas de las que derivaron.

Breve sumario

- 5 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier aspecto y ejemplo de la presente divulgación que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona meramente con fines ilustrativos.
- 10 La presente divulgación proporciona un proceso para obtener una cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante capaz de producir, en comparación con la cepa de levadura ancestral, más glicerol, menos etanol y menos acetato durante un proceso de fermentación alcohólica de un mosto de uva natural. El proceso se basa en el uso de una sal capaz de provocar un estrés hiperosmótico a la cepa de levadura ancestral así como en el cultivo de la cepa de levadura en una alta concentración de una fuente de carbono hasta el agotamiento de la fuente de carbono. Sorprendentemente, la cepa de levadura variante obtenida produce más glicerol, menos etanol y menos acetato que la cepa de levadura ancestral de la que derivan, incluso en ausencia de la sal.
- 15

De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un proceso para obtener una cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante capaz de producir, en comparación con la cepa de levadura ancestral, más glicerol, menos etanol y menos acetato en un proceso de fermentación alcohólica de un mosto de uva natural. En términos generales, el proceso comprende a) cultivar la cepa de levadura ancestral en un primer medio de cultivo que comprende una sal capaz de provocar un estrés hiperosmótico a la cepa de levadura ancestral, en donde la cepa de levadura ancestral se cultiva en concentraciones crecientes de sal y en condiciones para lograr el agotamiento de la glucosa en el primer medio de cultivo, a fin de obtener una primera cepa de levadura cultivada, en donde la concentración de la sal en el primer medio de cultivo está entre 1,25 M y menos de 2,4 M; y b) cultivar la primera cepa de levadura cultivada en un segundo medio de cultivo que comprende la sal, en donde la primera cepa de levadura cultivada se cultiva a una concentración salina fija y en condiciones que permitan alcanzar el agotamiento de la glucosa en el segundo medio de cultivo de tal manera que se obtenga la cepa de levadura variante, en donde la concentración de la sal en el segundo medio de cultivo es al menos 2,4 M. La sal usada en el proceso tiene un contracación que es diferente de un catión sodio. La sal usada en el proceso tiene un catión que carece de toxicidad con respecto a la cepa de levadura ancestral cuando se usa a una concentración para proporcionar una osmolalidad inicial de al menos 1 500 mmol/kg. En una realización, la concentración de la sal en el primer medio de cultivo está entre 1,25 M y menos de 1,9 M. En una realización, el proceso comprende además, en la etapa a), aumentar la concentración de sal semanal o mensualmente. En algunas realizaciones, la concentración de glucosa en el primer medio de cultivo antes del cultivo puede estar entre el 14,0 % y el 8,0 % (p/v) o entre el 14,0 % y el 9,6 % (p/v) con respecto al volumen total del primer medio de cultivo. En algunas realizaciones, la concentración fija de glucosa del segundo medio de cultivo antes del cultivo es del 8,0 % (p/v) con respecto al volumen total del segundo medio de cultivo. En una realización, el proceso puede comprender además el cruzamiento de esporas haploides de la cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante para obtener una cepa híbrida variante. En otra realización más, la sal tiene un catión potasio, tal como, por ejemplo, KCl. En otra realización más, la cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces arboriculus*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriadzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces carsbergensis*, *Saccharomyces uvarum* e híbridos interespecie.

40

45 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante capaz de producir, en comparación con una cepa de levadura ancestral, más glicerol, menos etanol y menos acetato en un proceso de fermentación alcohólica de un mosto de uva natural, obteniéndose dicha variante de levadura por el procedimiento descrito en el presente documento. La cepa de levadura variante obtenida puede usarse para elaborar un producto fermentado, tal como vino (por ejemplo, vino tinto) o cerveza. En una realización, la cepa de levadura variante es al menos una de las depositadas en el Instituto Pasteur, el 9 de enero de 2014, con el número de registro de la Collection Nationale des Cultures des Microorganismes (CNCM) I-4832, la depositada en el Instituto Pasteur, el 18 de octubre de 2012 con el número de registro de la Collection Nationale des Cultures des Microorganismes (CNCM) I-4684 y la depositada en el Institut Pasteur, el 28 de enero de 2015 con el número de registro de la Collection Nationale des Cultures des Microorganismes (CNCM) I-4952, así como cualquier combinación de las mismas.

50

55 De acuerdo con un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un proceso para elaborar un producto fermentado. En términos generales, el proceso comprende poner en contacto la cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante descrita en el presente documento con un mosto de uva natural. En una realización, el producto fermentado es vino (por ejemplo, vino tinto).

60

Breve descripción de los dibujos

65 Habiendo descrito de esta manera generalmente la naturaleza de la invención, a continuación se hará referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La **Figura 1** muestra la concentración de glicerol (barras que proporcionan la concentración mínima y máxima) y el rendimiento de etanol (pastillas negras con las barras de error que proporcionan los rendimientos mínimo y máximo) (**A, B**) y la concentración de glicerol (barras) y la glucosa residual después de 15 (triángulos blancos con las barras de error que proporcionan las concentraciones máxima y mínima) y 30 (triángulos negros con las barras de error que proporcionan las concentraciones máxima y mínima) días de fermentación (**C, D**) para la cepa ancestral (EC1118), las poblaciones evolucionadas (gris oscuro, marcador que empieza por "PK") y los aislados (cepas evolucionadas) (gris claro, marcador que empieza por "K") de los linajes independientes a (A, C) y b (B, D). Las fermentaciones se llevaron a cabo en 300 ml de MS210, 260 g/l de glucosa, a 28 °C por triplicado. El número que aparece en los distintos marcadores se refiere al número de generaciones que las poblaciones y cepas fueron sometidas a evolución adaptativa.

La **Figura 2** muestra la ventaja selectiva de las cepas evolucionadas. Viabilidad de EC1118 (•, línea negra), K300.2(a) (▲, línea gris oscuro) y K300.1(b) (○, línea gris claro) durante el cultivo en YPD + 8 % de glucosa y KCl 2,4 M a 28 °C. Los resultados se muestran como el número ($\times 10^7$) de células vivas/ml en función del tiempo (horas). El agotamiento del azúcar se observa después de 100 horas. Cada punto incluye el valor medido así como la desviación típica.

La **Figura 3** ilustra los rendimientos de fermentación (**A**) y la población celular (**B**) de la cepa ancestral EC1118 (•, línea negra) y las cepas evolucionadas K300.2(a) (▲, línea gris oscuro) y K300.1(b) (○, línea gris claro) en medio MS210, 260 g/l de glucosa, a 28 °C. Los resultados del panel A se presentan como dCO_2/dt (g/l/H) en función del tiempo (horas). Los resultados en el panel B se presentan como el número de células ($\times 10^7$)/ml en función del tiempo (horas) e incluyen la desviación típica.

La **Figura 4** muestra los rendimientos de subproductos para las cepas EC1118 y K300.1(b). Los metabolitos se midieron después de 30 días de fermentación en 300 ml de MS210, 260 g/l de glucosa a 16 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C, 32 °C y 34 °C. Los resultados se muestran para etanol (**A**, proporcionado como g/g de glucosa consumida en función del tiempo y de la cepa usada), glicerol (**B**, proporcionado como g/g de glucosa consumida en función del tiempo y la cepa usada) y succinato (**C**, proporcionado como g/g de glucosa consumida en función del tiempo y la cepa usada). Cada punto incluye el valor medido así como la desviación típica.

La **Figura 5** ilustra la cinética de la fermentación del vino en garnacha para EC1118 (línea negra) y K300.1(b) (línea gris oscura). Se añadieron 72 mg/l de nitrógeno (15 g/hl de DAP y 30 g/hl de Fermaid®E) en el momento indicado con una flecha. Los resultados se muestran como dCO_2/dt (g/l/H) en función del tiempo (horas). Cada punto incluye el valor medido así como la desviación típica.

La **Figura 6** ilustra la cinética del ensayo de fermentación vírica N2 sobre mosto sintético que contiene 235 g/l de azúcares para la cepa ancestral (EC1118) y un híbrido de la generación H2. Los resultados se muestran como dCO_2/dt (g/l/H) en función del tiempo (horas).

La **Figura 7** ilustra la cinética del ensayo de fermentación vírica N3 sobre mosto sintético que contiene 260 g/l de azúcares para la cepa ancestral (EC1118) y un híbrido de la generación H2. Los resultados se muestran como dCO_2/dt (g/l/H) en función del tiempo (horas).

La **Figura 8** ilustra la cinética del ensayo de fermentación vírica N4 en un mosto de uva de la variedad Syrah para la cepa ancestral (EC1118) y un híbrido de la generación H2 (120-A5). Los resultados se muestran como dCO_2/dt (g/l/H) en función del tiempo (horas). Las flechas indican cuándo se añadió oxígeno a la fermentación.

Descripción detallada

Una opción atractiva y barata para obtener un vino con menor graduación alcohólica sería usar levaduras que produzcan menos alcohol a partir de la misma cantidad de azúcar. De hecho, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar cepas de levadura vírica modificadas con un rendimiento reducido de etanol. Uno de los enfoques más eficaces consistió en desviar el metabolismo hacia una mayor producción de glicerol y, por lo tanto, lejos del etanol. En *Saccharomyces cerevisiae*, el glicerol desempeña un papel importante en la homeostasis redox y en la resistencia al estrés osmótico: es el principal soluto compatible de la levadura. El glicerol se encuentra en los vinos en concentraciones en el intervalo de 5 a 9 g/l y contribuye positivamente a la calidad del vino aportándole cuerpo y dulzor. También puede conferir viscosidad a concentraciones muy elevadas (superiores a 25 g/l), como en los vinos *Botrytis*. Habitualmente, el redireccionamiento del carbono hacia el glicerol provocó una disminución sustancial de la producción de etanol y la acumulación de diversos compuestos, incluyendo acetato y acetoína, ambos no deseables para la calidad sensorial del vino. La ingeniería genética racional de las reacciones clave en el punto de ramificación del acetaldehído permitió limitar la acumulación de estos compuestos no deseables. De este modo, se obtuvieron cepas de bajo contenido alcohólico en las cuales el flujo de carbono se reorientó hacia el glicerol y el 2,3-butanodiol, un poliol sin impacto sensorial en los vinos. Estas levaduras del vino modificadas pueden reducir el contenido de alcohol del vino en un 1 a un 3 % (v/v). Sin embargo, la escasa aceptación por parte de los consumidores de la tecnología recombinante del ADN en los alimentos es un obstáculo importante para su comercialización. En consecuencia, hay un gran interés por usar enfoques alternativos de no OMG para perfeccionar las propiedades de las cepas de levadura vírica.

Proceso de obtención de cepas de levadura variantes de baja producción de etanol

- 5 Los experimentos de evolución adaptativa en laboratorio (ALE), basada en la adaptación a largo plazo de las levaduras a las limitaciones medioambientales o metabólicas, se ha usado para perfeccionar cepas de levadura para aplicaciones biotecnológicas, incluyendo la vinificación. Las evoluciones experimentales que usan cloruro sódico para generar estrés osmótico se han usado para estudiar los procesos evolutivos y, en trabajos más aplicados, para aumentar la tolerancia de las cepas panificadoras a la congelación. Se obtuvieron cepas industriales evolucionadas resistentes al NaCl, pero la producción de glicerol y etanol por las cepas evolucionadas no se vio afectada.
- 10 La presente divulgación proporciona un proceso para obtener una cepa de levadura variante. En el contexto de la presente divulgación, una "cepa de levadura variante" es una cepa de levadura mutante natural (es decir, no modificada genéticamente usando tecnología de ADN/ARN recombinante) que se ha seleccionado a partir de una cepa de levadura "ancestral" usando ALE (basado en la sal descrita en el presente documento) para redirigir el flujo de carbono hacia el glicerol y, en última instancia, reducir la producción de etanol durante la fermentación alcohólica.
- 15 La cepa de levadura ancestral y la cepa de levadura variante son organismos no modificados genéticamente, por ejemplo, su contenido genómico no se ha alterado por la introducción de moléculas de ácido nucleico exógeno o la eliminación de moléculas de ácido nucleico endógeno mediante técnicas de ingeniería genética. El grado alcohólico volumétrico (% v/v) de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura variante puede
- 20 reducirse en comparación con el grado alcohólico volumétrico de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura ancestral, entre aproximadamente el 0,40 % y el 2,00 % o al menos el 0,40 %, el 0,45 %, el 0,50 %, el 0,60 %, el 0,70 %, el 0,80 %, el 0,90 %, el 1,00 %, el 1,10 %, el 1,20 %, el 1,30 %, el 1,40 %, el 1,50 %, el 1,60 %, el 1,70 %, el 1,80 %, el 1,90 % o el 2,00 %. La relación entre el contenido de glicerol de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura variante y el contenido de glicerol de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura ancestral, puede estar entre 1,25 y 2,40 o al menos 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60, 1,70, 1,75, 1,80, 1,85, 1,90, 1,95, 2,00, 2,10, 2,15, 2,20, 2,25, 2,30, 2,35 o 2,40.
- 25 En el contexto de la presente divulgación, durante un proceso de fermentación alcohólica, la cepa de levadura "variante" no produce una cantidad de acetato, acetaldehído y acetoína que pueden alterar las propiedades organolépticas del producto fermentado. El contenido de acetato en el producto fermentado de un mosto de uva natural obtenido usando la cepa de levadura variante es inferior al correspondiente contenido de acetato en el producto fermentado de un mosto de uva natural obtenido usando la cepa de levadura ancestral. El contenido de acetato, acetaldehído o acetoína en el producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura variante puede ser igual a o menos que el contenido correspondiente de acetato, acetaldehído o acetoína en el producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura ancestral. El contenido de acetato, acetaldehído o acetoína en el producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura variante puede aumentar en comparación con el producto fermentado correspondiente obtenido usando la cepa de levadura ancestral, este aumento es igual a o menos que el 70 %. La cepa de levadura variante puede producir una mayor cantidad de uno o más compuestos (tal como 2,3-butanodiol), en comparación con la cepa de levadura ancestral, que no influye en las propiedades organolépticas del producto fermentado. En algunos casos, las cepas de levadura variantes no son más resistentes a un choque hiperosmótico provocado por la sal que la cepa de levadura ancestral, pero las cepas de levadura variantes muestran una mejor viabilidad y una ganancia de aptitud (en comparación con la cepa de levadura ancestral) en condiciones de estrés hiperosmótico e inanición de carbono.
- 30 35 40 45 50 55 60 65
- Para obtener la cepa de levadura variante, una cepa ancestral de levadura se somete a ALE y se cultiva en concentraciones crecientes de sal. La sal usada durante la ALE es capaz de provocar un estrés hiperosmótico a la cepa de levadura ancestral. En el contexto de la presente divulgación, la expresión estrés hiperosmótico (también denominado choque hiperosmótico) es un aumento de la concentración de solutos (por ejemplo, iónicos) alrededor de una célula de levadura que provoca un cambio rápido en el movimiento del agua a través de su membrana celular. En tales condiciones, puede producirse una inhibición del transporte de sustratos y cofactores al interior de la célula provocando de esta manera un choque. La sal en la ALE puede ser de un solo tipo de sal o una combinación de sales capaces de provocar un choque hiperosmótico. La sal o la combinación de sales usadas en la ALE descrita en el presente documento deben ser capaces de proporcionar una osmolalidad específica al medio de cultivo sin inducir toxicidad hacia la cepa progenitora. En el contexto de la presente divulgación, el catión de la sal (o combinación de sales) usado en la ALE carece de toxicidad con respecto a la cepa de levadura ancestral cuando se usa a una concentración para proporcionar una osmolalidad inicial de al menos 1 500 mmol/kg, al menos 1 600 mmol/kg, al menos 1 700 mmol/kg, al menos 1 800 mmol/kg, al menos 1 900 mmol/kg, al menos 2 000 mmol/kg, al menos 2 100 mmol/kg o al menos 2 200 mmol/kg. La sal usada en los procesos descritos en el presente documento tiene una contracción diferente a la del sodio. Por ejemplo, la sal puede tener una contracción de potasio. Tales sales incluyen, pero no se limitan a KCl. Tales sales excluyen el NaCl cuyo catión ha demostrado provocar toxicidad a la cepa de levadura ancestral. Tales sales también excluyen sulfitos, tales como sulfito sódico (Na₂SO₃), que generan cationes sodio y proporcionan cepas de levaduras solo modestamente capaces de disminuir el contenido de alcohol por volumen de los productos fermentados.
- En una primera etapa, el proceso de obtención de la cepa de levadura variante incluye el cultivo de cepas de levadura en concentraciones crecientes de sal. La cepa de levadura ancestral se usa para inocular (en una cantidad

- 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 4 400 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 4 300 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 4 200 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 4 100 mmol/kg.
- 5 La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 4 000 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 3 900 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 3 800 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 3 730 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 3 700 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 3 600 mmol/kg. La osmolalidad durante la primera etapa del proceso puede aumentar de (aproximadamente) 1 500 mmol/kg, 1 600 mmol/kg, 1 700 mmol/kg, 1 800 mmol/kg, 1 840 mmol/kg, 1 900 mmol/kg, 2 000 mmol/kg, 2 100 mmol/kg, 2 105 mmol/kg o 2 200 mmol/kg a (aproximadamente) 3 500 mmol/kg.
- 10 En términos generales, el proceso comprende al menos dos fases. En una primera fase, las levaduras se cultivan con una concentración de sal relativamente baja que se aumenta durante el cultivo. En una segunda fase, las levaduras se cultivan a una concentración de sal mayor y fija. Durante el proceso, la concentración inicial de fuente de carbono en el medio de cultivo (por ejemplo, antes del cultivo) es alta (al menos un 8 % (p/v) con respecto al volumen total del medio de cultivo) en el medio de cultivo para mantener los rendimientos fermentativos de la levadura cultivada en presencia de, inicialmente, una concentración relativamente alta de carbono. En el contexto de la presente divulgación, en ambas fases, las levaduras se cultivan hasta que se agota la fuente de carbono (por ejemplo, hasta que se alcanza un estado de inanición de carbono) del medio de cultivo antes de proceder a una nueva inoculación en un medio fresco.
- 15 Durante la primera fase del proceso, las levaduras se cultivan en un primer medio de cultivo que contiene la sal y la fuente de carbono. En el contexto de la presente divulgación, el "primer medio de cultivo" se refiere a un medio de cultivo que se usa durante la primera fase del proceso. El primer medio de cultivo puede ser cualquier tipo de medio adecuado para el crecimiento de levaduras. Aunque el primer medio de cultivo puede ser un medio sólido, el primer medio de cultivo es preferentemente un medio líquido. El medio adaptado a la levadura incluye, pero no se limitan a, el medio Peptona Dextrosa de Levadura (YPD) o un medio SD definido/sintético basado en un medio basado en nitrógeno de levadura. Opcionalmente, el primer medio de cultivo puede suplementarse con extracto de bactolevadura y bactopeptona.
- 20 Inicialmente, la concentración de la sal en el primer medio de cultivo se selecciona para aumentar la osmolalidad del primer medio de cultivo (es decir, para alcanzar al menos 1 500 mmol/kg, al menos 1 600 mmol/kg, al menos 1 700 mmol/kg, al menos 1 800 mmol/kg, al menos 1 840 mmol/kg, al menos 1 900 mmol/kg, al menos 2 000 mmol/kg, al menos 2 100 mmol/kg, al menos 2 105 mmol/kg o al menos 2 200 mmol/kg) y provocar una reducción del crecimiento (en comparación con una levadura en el mismo medio sin la sal) de la cepa ancestral (que no ha sido cultivada previamente en presencia de una concentración de sal tan elevada). Esta reducción del crecimiento puede ser, por ejemplo, de al menos de aproximadamente 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 veces o incluso más, en comparación con la cepa de levadura ancestral cultivada en condiciones similares pero en ausencia de la sal. Esta concentración de sal puede corresponder a 1,25 M cuando se usa KCl como sal para suplementar un medio YPD y proporciona una osmolalidad de aproximadamente 2 105 mmol/kg. En lo sucesivo, las levaduras se cultivan en concentraciones crecientes de sal. Durante la primera fase, la concentración de sal está entre aproximadamente 1,25 M y menos de aproximadamente 2,4 M. La concentración de sal puede ser de al menos aproximadamente 1,30 M, 1,40 M, 1,50 M, 1,60 M, 1,70 M, 1,80 M, 1,90 M, 2,0 M, 2,1 M, 2,2 M o 2,3 M. La concentración de sal en el primer medio de cultivo puede aumentarse en serie de aproximadamente 1,25 M a aproximadamente 1,30 M, de aproximadamente 1,30 M a aproximadamente 1,40 M, de aproximadamente 1,40 M a aproximadamente 1,50 M, de aproximadamente 1,50 M a aproximadamente 1,60 M, de aproximadamente 1,60 M a aproximadamente 1,70 M, de aproximadamente 1,70 M a aproximadamente 1,80 M, de aproximadamente 1,80 M a aproximadamente 1,90 M, de aproximadamente 1,9 M a aproximadamente 2,0 M, de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 2,1 M, de aproximadamente 2,1 M a aproximadamente 2,2 M, de aproximadamente 2,2 M a aproximadamente 2,3 M y de aproximadamente 2,3 M a aproximadamente 2,4 M. Este
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

aumento en serie puede realizarse a intervalos predeterminados, por ejemplo, a intervalos semanales o a intervalos mensuales. La primera fase puede comprender dos subfases: una primera subfase en la cual la concentración de sal se aumenta semanalmente (por ejemplo, aumentando la concentración de sal de aproximadamente 1,25 M a aproximadamente 1,9 M) y una segunda subfase en la cual la concentración de sal se aumenta mensualmente (por ejemplo, aumentando la concentración de sal de aproximadamente 1,9 M a aproximadamente 2,4 M).

5 El primer medio de cultivo comprende también una fuente de carbono disponible, tal como glucosa. La concentración inicial de la fuente de carbono en el primer medio de cultivo se selecciona para permitir el mantenimiento de buenos rendimientos fermentativos de las levaduras. Por ejemplo, antes del cultivo con las levaduras, la concentración de la fuente de carbono en el primer medio de cultivo es al menos el 8 % (p/v), entre aproximadamente el 8 % y 10

10 aproximadamente el 14 % (p/v) o entre aproximadamente el 9,6 % (p/v) y aproximadamente el 14 % (p/v) con respecto al volumen total del medio de cultivo. Durante la primera fase, la concentración inicial de la fuente de carbono puede ser al menos aproximadamente el 8,0 %, el 8,4 %, el 8,8 %, el 9,2 %, el 9,6 %, el 10,0 %, el 10,4 %, el 10,8 %, el 11,2 %, el 11,6 %, el 12,0 %, el 12,4 %, el 12,8 %, el 13,2 %, el 13,6 % o el 14 %, preferentemente al menos 15

15 aproximadamente el 9,6 %, el 10,0 %, el 10,4 %, el 10,8 %, el 11,2 %, el 11,6 %, el 12,0 %, el 12,4 %, el 12,8 %, el 13,2 %, el 13,6 % o el 14,0 % (p/v con respecto al volumen total del medio de cultivo). La concentración de fuente de carbono en el primer medio de cultivo puede disminuirse en serie de aproximadamente el 14,0 % a aproximadamente el 13,6 %, de aproximadamente el 13,6 % a aproximadamente el 13,2 %, de aproximadamente el 13,2 % a 20

20 aproximadamente el 12,8 %, de aproximadamente el 12,8 % a aproximadamente el 12,4 %, de aproximadamente el 12,4 % a aproximadamente el 12,0 %, de aproximadamente el 12,0 % a aproximadamente el 11,6 %, de aproximadamente el 11,6 % a aproximadamente el 11,2 %, de aproximadamente el 11,2 % a 25

25 aproximadamente el 10,8 %, de aproximadamente el 10,8 % a aproximadamente el 10,4 %, de aproximadamente el 10,4 % a aproximadamente el 10,0 %, de aproximadamente el 10,0 % a aproximadamente el 9,6 %, de aproximadamente el 9,6 % a aproximadamente el 9,2 %, de aproximadamente el 9,2 % a 30

30 aproximadamente el 8,8 %, de aproximadamente el 8,8 % a aproximadamente el 8,4 % y de aproximadamente el 8,4 % a aproximadamente el 8,0 %. Esta disminución en serie puede realizarse a intervalos predeterminados, por ejemplo, a intervalos semanales o a intervalos mensuales. La primera fase puede comprender dos subfases: una primera subfase en la cual la concentración de la fuente de carbono disminuye semanalmente (por ejemplo, disminuyendo la concentración de carbono de aproximadamente el 14 % a aproximadamente el 9,6 %) y una segunda subfase en la cual la concentración de la fuente de carbono aumenta mensualmente (por ejemplo, disminuyendo la concentración de la fuente de carbono de aproximadamente el 9,6 % a aproximadamente el 8,0 %).

35 En la etapa inicial de la primera fase, la cepa de levadura ancestral puede inocularse primero a una concentración predeterminada (por ejemplo, una DO_{600} de 1,0, por ejemplo) en el primer medio de cultivo. La cepa ancestral se cultiva en condiciones que permitan el crecimiento de la levadura (por ejemplo, 28 °C con agitación). Las levaduras se cultivan en el primer medio de cultivo hasta que la fuente de carbono (habitualmente glucosa) se haya metabolizado (por ejemplo, agotado). El tiempo necesario para alcanzar el agotamiento del carbono dependerá del tipo de medio de cultivo usado, la cantidad de levaduras usadas para inocular el medio de cultivo, las condiciones de incubación, así como la cantidad inicial de la fuente de carbono. Sin embargo, después de aproximadamente 4 a 7 generaciones (es decir, 40

40 aproximadamente una semana), se considera agotada la fuente de carbono en un medio YPD suplementado con un 8 % (p/p) de glucosa e inoculado a una DO_{600} de 1,0 con levaduras cultivadas. En otro ejemplo, después de aproximadamente 8 a 14 generaciones (es decir, aproximadamente dos semanas), se considera agotada la fuente de carbono en un medio YPD suplementado con un 14 % (p/p) de glucosa e inoculado a una DO_{600} de 1,0 con levaduras cultivadas.

45 Durante la primera fase, una vez agotada la fuente de carbono del medio de cultivo, las levaduras cultivadas pueden mantenerse en una fase de inanición de carbono o pueden inocularse en un medio nuevo que contenga una mayor concentración de sal y una fuente adicional de carbono disponible. Durante la primera fase, el aumento de la concentración de sal entre dos medios de cultivo puede ser, por ejemplo, 0,05 M (inicialmente) y 0,1 M (después). 50 Puede hacerse un aumento más o menos importante de la concentración de sal para conseguir resultados similares. La primera fase se mantiene durante al menos aproximadamente 175 días, al menos aproximadamente 25 semanas o al menos aproximadamente 100 generaciones. La primera fase puede mantenerse hasta que la tasa de crecimiento de las levaduras cultivadas aumente en al menos aproximadamente el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 % o el 10 % en comparación con la tasa de crecimiento de las levaduras cultivadas al inicio de la primera fase (cuando se observa 55 una reducción de la tasa de crecimiento debido a la presencia de la sal).

60 Cuando se aumenta la concentración de sal en el primer medio de cultivo, puede disminuirse una concentración de glucosa correspondiente en el primer medio de cultivo. Por ejemplo, cuando se aumenta la concentración de sal en 0,1 M en el primer medio de cultivo, la concentración de glucosa puede disminuirse (antes del cultivo) en un 0,4 % (p/v) con respecto al volumen total del primer medio de cultivo. Cuando se aumenta la concentración de sal en aproximadamente 0,05 M en el primer medio de cultivo, la concentración de glucosa (antes del cultivo) puede disminuirse en aproximadamente un 0,2 % (p/v) con respecto al volumen total del primer medio de cultivo.

65 Una vez se ha completado la primera fase del proceso, en una segunda fase, las levaduras se cultivan en un segundo medio de cultivo que contiene la sal y la fuente de carbono. En el contexto de la presente divulgación, el "segundo medio de cultivo" se refiere a un medio de cultivo que se usa durante la segunda fase del proceso. El segundo medio

de cultivo puede ser cualquier tipo de medio adecuado para el crecimiento de levaduras. Aunque el segundo medio de cultivo puede ser un medio sólido, el segundo medio de cultivo es preferentemente un medio líquido. El medio adaptado a la levadura incluye, pero no se limitan a, el medio Peptona Dextrosa de Levadura (YPD) o un medio SD definido/sintético basado en un medio basado en nitrógeno de levadura. Opcionalmente, el segundo medio de cultivo puede suplementarse con extracto de bactolevadura y bactopeptona.

Durante la segunda fase, el segundo medio de cultivo tiene una concentración de sal que es la misma o más alta que la del primer medio de cultivo al final de la primera fase. Sin embargo, durante la segunda fase, la concentración de sal permanece igual y no aumenta. La concentración de sal del segundo medio de cultivo es de al menos 2,4 M. La concentración de sal del segundo medio de cultivo puede ser de 2,4 M. El segundo medio de cultivo puede tener una osmolalidad de como máximo aproximadamente 4 800 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 740 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 700 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 600 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 500 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 400 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 300 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 200 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 100 mmol/kg, como máximo aproximadamente 4 000 mmol/kg, como máximo aproximadamente 3 900 mmol/kg, como máximo aproximadamente 3 800 mmol/kg, como máximo aproximadamente 3 730 mmol/kg, como máximo aproximadamente 3 700 mmol/kg, como máximo aproximadamente 3 600 mmol/kg o como máximo aproximadamente 3 500 mmol/kg.

Como se ha indicado anteriormente, el segundo medio de cultivo también comprende una fuente de carbono, tal como glucosa. La concentración inicial de la fuente de carbono en el segundo medio de cultivo se selecciona para permitir el mantenimiento de buenos rendimientos fermentativos de las levaduras. La concentración inicial de la fuente de carbono en el segundo medio de cultivo puede ser igual a o menos que la concentración inicial de la fuente de carbono en el primer medio de cultivo al final de la primera fase del proceso. Además, la concentración inicial de glucosa (antes del cultivo) en el segundo medio de cultivo sigue siendo la misma durante la segunda fase. Antes del cultivo con las levaduras, la concentración de glucosa en el segundo medio de cultivo puede estar entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 14 % (p/v), preferentemente entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 10 % (p/v) y aún más preferentemente alrededor del 8 % (p/v con respecto al volumen total del segundo medio de cultivo). La concentración de sal del segundo medio de cultivo puede ser de 2,4 M. Cuando se usa KCl a tal concentración para suplementar un medio YPD, esto corresponde a una osmolalidad de aproximadamente 3 730 mmol/kg.

Durante la segunda fase, la primera cepa de levadura cultivada (por ejemplo, una cepa de levadura que ha sido sometida y completado la primera fase del proceso) se inocula primero a una concentración predeterminada (por ejemplo, una DO_{600} de 1,0) en el segundo medio de cultivo que contiene la sal así como la fuente de carbono. La cepa de levadura se cultiva en condiciones que permitan el crecimiento de la levadura (por ejemplo, 28 °C con agitación). Las levaduras se cultivan en el segundo medio de cultivo hasta que la fuente de carbono (habitualmente glucosa) se haya metabolizado (por ejemplo, agotado). El tiempo necesario para alcanzar el agotamiento del carbono dependerá del tipo de medio de cultivo usado, la cantidad de levaduras usadas para inocular el medio de cultivo, las condiciones de incubación, así como la cantidad inicial de la fuente de carbono. Sin embargo, después de aproximadamente 4 a 7 generaciones (es decir, aproximadamente una semana), se considera agotada la fuente de carbono en un medio YPD suplementado con aproximadamente un 8 % (p/p) de glucosa e inoculado a una DO_{600} de 1,0 con levaduras cultivadas.

Durante la segunda fase, una vez agotada la fuente de carbono del medio de cultivo, las levaduras cultivadas se mantienen en un estado de inanición de glucosa o se inoculan en un medio nuevo que contiene la misma concentración de sal y la misma concentración de fuente de carbono que el medio anterior. Durante la segunda fase, la concentración de sal puede ser de aproximadamente 2,4 M y la concentración de glucosa puede ser de aproximadamente el 8,0 % (p/p). La segunda fase puede mantenerse durante al menos aproximadamente 553 días, al menos aproximadamente 79 semanas y/o al menos aproximadamente 200 generaciones. La segunda fase puede durar hasta que la cepa de levadura cultivada presenta un fenotipo estable con respecto a la producción de glicerol y etanol en ausencia del estrés salino.

El primer y el segundo medios de cultivo pueden tener el mismo medio de base y diferenciarse únicamente con respecto a la sal, la concentración de sal, la fuente de carbono y/o la concentración de la fuente de carbono. Como alternativa, el primero y el segundo pueden tener un medio de base diferente.

Al final de la segunda fase del proceso, se espera que las cepas de levadura cultivadas (ahora denominadas cepas de levadura variantes) tengan la capacidad de producir más glicerol durante una fermentación alcohólica que la cepa de levadura ancestral. Por ejemplo, la relación entre el contenido de glicerol de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con las cepas de levadura variantes y el contenido de glicerol de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura ancestral, puede estar entre 1,25 y 2,40 o al menos aproximadamente 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60, 1,70, 1,75, 1,80, 1,85, 1,90, 1,95, 2,00, 2,10, 2,15, 2,20, 2,25, 2,30, 2,35 o 2,40. También se espera que las cepas de levadura variantes tengan la capacidad de producir menos etanol durante una fermentación alcohólica que la cepa de levadura ancestral. Por ejemplo, puede reducirse el grado alcohólico volumétrico (% v/v) de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura variante, en comparación con el grado alcohólico volumétrico de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura ancestral, en al menos el 0,40 % o entre aproximadamente el 0,40 % y el 2,00 % o en al menos

aproximadamente el 0,40 %, el 0,45 %, el 0,50 %, el 0,60 %, el 0,70 %, el 0,80 %, el 0,90 %, el 1,00 %, el 1,10 %, el 1,20 %, el 1,30 %, el 1,40 %, el 1,50 %, el 1,60 %, el 1,70 %, el 1,80 %, el 1,90 % o el 2,00 %. La cepa de levadura variante puede producir una mayor cantidad de uno o más compuestos (tal como 2,3-butanodiol), en comparación con la cepa de levadura ancestral, que no influye en las propiedades organolépticas del producto fermentado.

5 Las cepas de levadura variantes pueden someterse opcionalmente a un cruzamiento convencional (que excluye las manipulaciones de ingeniería genética) para aumentar aún más su capacidad de producir glicerol, disminuir su capacidad de producir etanol durante una fermentación alcohólica y/o producir híbridos interespecie que tengan un fenotipo similar. El cruzamiento convencional se realizó con levaduras de la misma especie (por ejemplo, cría intraespecie) o con levaduras de especies diferentes (por ejemplo, cría interespecie). Tales técnicas de cruzamiento son conocidas por los expertos en la materia e incluyen habitualmente (i) la producción de esporas de levadura haploides a partir de una cepa de levadura variante seleccionada, (ii) la selección de cepas haploides que tengan el fenotipo deseado (por ejemplo, una capacidad aumentada de producir glicerol y/o una capacidad disminuida de producir etanol durante una fermentación alcohólica) y (iii) el cruzamiento de las cepas haploides seleccionadas para obtener una cepa híbrida estable (por ejemplo, diploide) y la selección de una cepa híbrida que tenga el fenotipo deseado (por ejemplo, una capacidad aumentada de producir glicerol, una capacidad disminuida de producir etanol durante una fermentación alcohólica y/o un híbrido interespecie que tiene el fenotipo deseado (estable)). Esta etapa de cruzamiento opcional puede usarse para obtener híbridos de 1^a generación (por ejemplo, habitualmente denominados H1), híbridos de 2^a generación (por ejemplo, denominados habitualmente H2) e incluso de 3^a generación (por ejemplo, denominados habitualmente H3). Como se ha indicado anteriormente, la etapa de cruzamiento puede incluir la generación de híbridos intraespecie e interespecie).

10

15

20

25

Antes o después del cruzamiento, la cepa de levadura variante puede someterse opcionalmente a una etapa adicional para determinar su capacidad para llevar a cabo la respiración celular. Las cepas de levadura variantes capaces de respiración celular se consideran útiles para aplicaciones vinícolas.

30 El proceso descrito en el presente documento se aplica a levaduras *Saccharomyces* sp. y es especialmente útil para la generación de cepas de levadura variantes destinadas a ser usadas en fermentaciones alcohólicas. Las levaduras ilustrativas incluyen, pero no se limitan a *Saccharomyces arboricolus*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriadzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces carsbergensis* y *Saccharomyces uvarum*.), *Brettanomyces* sp. (Teleomorfo *Dekkera* sp.), *Candida* (Teleomorfos para diferentes especies de varios géneros incluyendo *Pichia* sp., *Metschnikowia* sp., *Issatchenka* sp., *Torulaspora* sp. y *Kluyveromyces* sp.), *Kloeckera* sp. (Teleomorfo *Hanseniaspora* sp.), *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp. y/o *Zygosaccharomyces* sp así como híbridos interespecie derivados de una cualquiera de estas especies de levadura.

35

Cepas de levadura variantes y su uso en la fermentación alcohólica

La presente divulgación también se refiere a la cepa de levadura variante obtenida por el proceso descrito en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la "cepa de levadura variante", durante una fermentación alcohólica de un mosto de uva natural, produce más glicerol, menos etanol y menos acetato que su correspondiente cepa de levadura ancestral y se obtiene mediante el proceso descrito en el presente documento. Como tales, los productos fermentados obtenidos usando la cepa de levadura variante tienen menos etanol que los productos fermentados obtenidos usando la cepa de levadura ancestral. Por ejemplo, puede reducirse el grado alcohólico volumétrico (% v/v) de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura variante, en comparación con el grado alcohólico volumétrico de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura ancestral, entre aproximadamente el 0,40 % y aproximadamente el 2,00 % o al menos aproximadamente el 0,40 %, el 0,45 %, el 0,50 %, el 0,60 %, el 0,70 %, el 0,80 %, el 0,90 %, el 1,00 %, el 1,10 %, el 1,20 %, el 1,30 %, el 1,40 %, el 1,50 %, el 1,60 %, el 1,70 %, el 1,80 %, el 1,90 % o el 2,00 %. Además, los productos fermentados obtenidos usando la cepa de levadura variante tienen más glicerol que los productos fermentados obtenidos usando la cepa de levadura ancestral. Por ejemplo, la relación entre el contenido de glicerol de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura variante y el contenido de glicerol de un producto fermentado (por ejemplo, vino) obtenido con la cepa de levadura ancestral, está entre aproximadamente 1,25 y aproximadamente 2,40 o al menos aproximadamente 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60, 1,70, 1,75, 1,80, 1,85, 1,90, 1,95, 2,00, 2,10, 2,15, 2,20, 2,25, 2,30, 2,35 o 2,40. En algunos casos, la cepa de levadura "variante", durante una fermentación alcohólica, no produce una cantidad de acetato, acetaldehído y acetoína (en comparación con la "cepa de levadura ancestral") que pueden alterar las propiedades organolépticas del producto fermentado. El contenido de acetato en un producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura variante en una fermentación alcohólica de un mosto de uva natural es menos que el contenido correspondiente de acetato en el producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura ancestral en una fermentación alcohólica de un mosto de uva natural. Por ejemplo, el contenido de acetato, acetaldehído o acetoína en el producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura variante puede ser igual a o menos que el contenido correspondiente de acetato, acetaldehído o acetoína en el producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura ancestral. Como alternativa, el contenido de acetato, acetaldehído o acetoína en el producto fermentado obtenido usando la cepa de levadura variante puede aumentar en comparación con el producto fermentado correspondiente obtenido usando la cepa de levadura ancestral. La cepa de levadura variante puede producir una mayor cantidad de uno o más compuestos (tal como 2,3-butanodiol), en comparación con la cepa de levadura ancestral, que no influye en las propiedades organolépticas del producto.

40

45

50

55

60

65

fermentado. En algunos casos, las cepas de levadura variantes no son más resistentes a un choque hiperosmótico provocado por la sal que la cepa de levadura ancestral, pero las cepas de levadura variantes muestran una mejor viabilidad y una ganancia de aptitud (en comparación con la cepa de levadura ancestral) en condiciones de estrés hiperosmótico e inanición de carbono.

5 Una de las cepas de levadura variantes ilustrativa de la presente divulgación se ha depositado en el Instituto Pasteur, el 9 de enero de 2014, con el número de registro CNCM I-4832. Otra cepa de levadura variante ilustrativa de la
 10 presente divulgación se ha depositado en el Instituto Pasteur, el 18 de octubre de 2012 con el número de registro CNCM I-4684. Una cepa de levadura adicional se ha depositado en el Instituto Pasteur, el 18 de octubre de 2012 con el número de registro CNCM I-4685. En otra cepa más de levadura variante ilustrativa de la presente divulgación se ha depositado en el Instituto Pasteur, el 28 de enero de 2015 con el número de registro CNCM I-4952.

15 La presente divulgación también se refiere al uso de la cepa de levadura variante durante un proceso de fermentación alcohólica en el cual está garantizado limitar el contenido de alcohol del producto fermentado final. En el proceso de elaboración de un producto fermentado que tiene un contenido alcohólico, la cepa de levadura variante se pone en contacto con un mosto de uva natural y la fermentación se lleva a cabo en condiciones que permitan completar la fermentación alcohólica. Las cepas de levadura variantes son especialmente útiles en los procesos de elaboración de vinos (por ejemplo, vino tinto, blanco, rosado, espumoso o fortificado). Opcionalmente, la cepa de levadura variante puede suministrarse en una formulación desecada y someterse a una etapa de rehidratación antes de la fermentación.

20 20 La cepa de levadura variante puede proporcionarse en una formulación líquida y someterse a una etapa de dilución y/o a una etapa de descongelación antes de la fermentación. La cepa de levadura variante por sí sola puede usarse para completar la fermentación alcohólica. Como alternativa, la cepa de levadura variante puede mezclarse con otra cepa de levadura para fermentar. Cuando el producto fermentado es un vino blanco, la fermentación puede llevarse a cabo a una temperatura por debajo de aproximadamente 25 °C, habitualmente a aproximadamente entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 24 °C. Cuando el producto fermentado es un vino tinto, la fermentación puede realizarse a una temperatura igual o superior a aproximadamente 25 °C, por ejemplo, a una temperatura entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 30 °C o, a una temperatura entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 28 °C (por ejemplo, 28 °C). En algunas cepas de levadura variantes descritas en el presente documento, se ha observado un cambio metabólico hacia la producción de glicerol cuando las levaduras se incuban a una temperatura superior a aproximadamente 24 °C. En una cepa tal de levaduras variante, la reducción máxima de la producción de etanol se observó a aproximadamente 28 °C. Como tal, algunas de las cepas de levaduras variantes descritas en el presente documento son especialmente adecuadas para proporcionar un menor contenido de alcohol en los vinos tintos. Los vinos resultantes opcionalmente pueden filtrarse y embotellarse, tal cual se hace actualmente en la técnica.

25 30 35

Las cepas de levadura variantes pueden usarse para fermentar el mosto de diferentes especies de uva (solas o en combinación), tales como *Vitis vinifera*, así como especies híbridas de uva que combinen uno o más de *V. labrusca*, *V. aestivalis*, *V. rupestris*, *V. rotundifolia* y *V. riparia*. Las cepas de levadura variantes pueden usarse para fermentar el mosto de diferentes variedades de uva (solas o en combinación) usadas para producir vino tinto, blanco, rosado, espumoso o fortificado. Las variedades de uva usadas para elaborar vinos tintos incluyen, pero no se limitan a, Aghiorghitiko, Aglianico, Aleatico, Alicante Bouschet, Aramon, Baga, Barbera, Blaufrankisch, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Canaiolo, Carignan, Carmenere, Cinsaut, Dolcetto, Dornfelder, Elbling, Freisa, Gaglioppo, Gamay, Grenache/Garnacha, Grignolino, Malbec, Mavrud, Melnik, Merlot, Mondeuse (Refosco), Montepulciano, Nebbiolo, Negroamaro, Nero d'Avola, Nielluccio, Periquita, Petit y Gros Manseng, Petit Verdot, Petite Sirah, Sagrantino, Sangiovese, Saperavi, Saint Laurent, Syrah/Shiraz, Tannat, Tempranillo, Teroldego, Tinta Barroca, Tinto Cao, Touriga Francesa, Xinomavro y/o Zinfandel. Las variedades de uva usadas para elaborar vinos blancos incluyen, pero no se limitan a, Airen, Albana, Albarino (Alvarinho), Aligote, Arneis, Bacchus, Bombino, Chardonnay, Chasselas, Chenin Blanc, Clairette, Ehrenfelsner, Elbling, Ezerjo, Fernao Pires, Furmint, Garganega, Gewurztraminer, Grechetto, Greco, Grillo, Gruner Veltliner, Harslevelu, Huxelrebe, Inzolia, Iona, Jacquere, Kerner, Listan, Macabeo, Malvasia, Marsanne, Melon de Bourgogne, Optima, Palomino, Parellada, Pedro Ximenez, Picpoul, Pinot Blanc, Pinot Gris/Grigio, Reichensteiner, Riesling, Rkatsiteli, Robola, Roditis, Sauvignon Blanc, Savagnin, Scheurebe, Semilion, Silvaner, Tocai Friulano, Torrontes, Trebbiano, Ugni-Blanc, Verdejo, Verdelho, Verdicchio, Vermentino, Vernaccia di San Gimignano, Viognier, Welschriesling y/o Xarel-lo.

55 60 Algunas de las ventajas de usar la cepa de levadura variante en procesos de elaboración de un producto fermentado (tal como vino) incluyen, pero no se limitan a, evitar el uso de cepas de levadura modificadas genéticamente, evitar usar procedimientos mecánicos de desalcoholización (por ejemplo, ósmosis inversa, nanofiltración o destilación) y/o la aplicabilidad a diversas variedades de uva, irrelevante para el contenido inicial de azúcar. Como tal, el proceso de obtención de un producto fermentado que tiene alcohol (tal como un vino) puede excluir el uso de una cepa de levadura modificada genéticamente y/o el uso de procedimientos mecánicos de desalcoholización.

65 Las cepas de levadura variantes son especialmente útiles en los procesos de elaboración de vinos (por ejemplo, rojo, blanco, rosado, espumoso o fortificado). La cepa de levadura variante se pone en contacto con un mosto de vino y la fermentación se lleva a cabo en condiciones que permitan completar la fermentación alcohólica. Opcionalmente, la cepa de levadura variante puede someterse a una etapa de rehidratación antes de la fermentación. La cepa de levadura variante por sí sola puede usarse para completar la fermentación alcohólica. Como alternativa, la cepa de

levadura variante puede mezclarse con otra cepa de levadura para fermentar. Cuando el producto fermentado es un vino blanco, la fermentación puede llevarse a cabo a una temperatura por debajo de aproximadamente 25 °C, habitualmente a aproximadamente entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 24 °C. Cuando el producto fermentado es un vino tinto, la fermentación puede realizarse a una temperatura igual o superior a aproximadamente

5 25 °C, por ejemplo, a una temperatura entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 30 °C o, a una temperatura entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 28 °C (por ejemplo, 28 °C). En algunas cepas de levadura variantes descritas en el presente documento, se ha observado un cambio metabólico hacia la producción de glicerol cuando las levaduras se incuban a una temperatura superior a aproximadamente 24 °C. En una cepa tal de levaduras variante, la reducción máxima de la producción de etanol se observó a aproximadamente 28 °C. Como tal, algunas de las cepas 10 de levaduras variantes descritas en el presente documento son especialmente adecuadas para proporcionar un menor contenido de alcohol en los vinos tintos. Los vinos resultantes opcionalmente pueden filtrarse y embotellarse, tal cual se hace actualmente en la técnica.

15 Las cepas de levadura variantes también pueden usarse para fermentar el almidón derivado de los cereales (por ejemplo cereales malteados) en aplicación de cervecería para la elaboración de cerveza.

La presente invención se entenderá más fácilmente refiriéndose a los siguientes ejemplos.

EJEMPLO I: EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DE LABORATORIO BASADA EN KCl

20 *Cepa de levadura y condiciones de crecimiento.* Se usó la cepa de levadura vírica *S. cerevisiae* Lalvin EC1118® como la cepa ancestral. Antes de ALE, las levaduras se propagaron en medio YPD rico (1 % de extracto de bacto levadura (DB), 2 % de bactopeptona (DB), 2 % de glucosa; Legallais) o en medio sintético SD (0,67 % de base nitrogenada de levadura Difco sin aminoácidos (DB), 2 % de glucosa) y se mantuvieron en placas YPD (2 % de agar) a 4 °C o se almacenaron a -80 °C en glicerol al 20 %.

25 *Ensayo de resistencia al KCl.* EC1118 se cultivó en 60 ml de YPD con KCl en concentraciones que variaban de 0,5 a 3 M, a 28 °C, en agitación. Se midió la densidad óptica a 600 nm cada 6 horas hasta las 240 horas y se comparó el crecimiento para las distintas condiciones.

30 *Evolución adaptativa en laboratorio (ALE).* La evolución adaptativa se basó en un procedimiento de transferir en serie a largo plazo usando KCl como inductor de estrés. La cepa EC1118 se cultivó durante la noche a 28 °C en 5 ml de YPD y la suspensión celular resultante se usó para inocular tubos tapados (13 ml), conteniendo cada uno 5 ml de medio con un 1 % de extracto bacto levadura, 2 % de bactopeptona, 14 % de glucosa y KCl 1,25 M (Sigma-Aldrich).

35 Se realizaron experimentos de evolución por duplicado y también un control sin estrés. Los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación a 225 rpm. Después de 7 días, correspondiente a aproximadamente 5 generaciones, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO₆₀₀) y se usó una alícuota para inocular un medio fresco de tal manera que la DO₆₀₀ fuera 1. Tales transferencias en serie se repitieron durante 450 generaciones. Cada 50 generaciones, se tomaron muestras de 1 ml de la población en evolución y se almacenaron a -80 °C en glicerol al 20 % para su posterior 40 análisis.

Después de 7 días de cultivo, los cultivos se inocularon en un medio YPD que contenía 13,6 % de glucosa y KCl 1,30 M. A continuación, cada semana, los subcultivos se inocularon en un medio en el cual la concentración de KCl se aumentó en 0,1 M adicional y la concentración de glucosa se redujo en un 0,4 % adicional. Esta fase duró entre d₇ y d₄₉. En lo sucesivo cada 4 semanas, la concentración de KCl se aumentó en 0,1 M y la glucosa se redujo en 0,4 %. Estas fases duraron entre d₄₉ y d₇₂₈.

45 *Fermentación del vino (a escala de laboratorio).* Los experimentos de fermentación por lotes se llevaron a cabo en medio sintético (MS), que imita un zumo de uva convencional. El medio MS se preparó como se describe por Bely *et al.* con las siguientes modificaciones: 260 g/l de glucosa, 210 mg/l de nitrógeno disponible, 7,5 mg/l de ergosterol, 0,21 g/l de Tween® y 2,5 mg/l de ácido oleico (medio MS210). Las fermentaciones en mosto de uva se realizaron en las mismas condiciones, usando Chardonnay- Coursan 2011 previamente pasteurizado instantáneo. Las fermentaciones se realizaron en fermentadores de 330 ml que contenían 300 ml de medio, se inocularon con 0,5 x 10⁶ células por ml y se incubaron a 28 °C con agitación continua (350 rpm). Para estudiar la flexibilidad metabólica de las cepas evolucionadas y ancestrales, se usaron diferentes temperaturas (16, 20, 24, 32 y 34 °C). La cinética de fermentación se controló mediante el cálculo de la cantidad liberada de CO₂, determinada pesando manualmente los fermentadores. Todos los experimentos de fermentación se realizaron por triplicado. Al final de la fermentación se analizaron los metabolitos extracelulares y los compuestos volátiles.

50 *Fermentación del vino (escala piloto).* Las fermentaciones a escala piloto se realizaron en depósitos cilíndricos de acero inoxidable de 1 hl con mosto de uva de la variedad garnacha. Este mosto de uva, que contiene 269 g/l de azúcares y 186 mg/l de nitrógeno, se pasteurizó instantáneo y se almacenó a 2 °C antes de la fermentación. El mosto de garnacha se inoculó a 25 g/hl con levaduras secas activas EC1118 y K300.1(b) (Lallemand, Toulouse, Francia). La producción de CO₂ se determinó usando un caudalímetro de gas Brooks serie 5810 TR (Brooks Instrument, PA, EE.UU.), como se describe por Aguera y Sablayrolles. Las fermentaciones se realizaron en condiciones isotérmicas a 28 °C. Se añadió oxígeno disuelto durante la fermentación para limitar el riesgo de bloqueo de la fermentación. Se

realizó una transferencia de 4 mg/l, 7 mg/l y 10 mg/l de oxígeno cuando el CO₂ liberado alcanzó los 7,2 g/l, 13,5 g/l y 45 g/l respectivamente. Se añadió nitrógeno (72 mg/l) en forma de 15 g/hl de DAP y 30 g/hl de FermaidE a 45 g/l de CO₂ liberado.

- 5 *Viabilidad de las cepas evolucionadas.* Las células ancestrales y evolucionadas se cultivaron en 50 ml de YPGluKCl (1 % de extracto de bacto levadura, 2 % de bactopeptona, 8 % de glucosa y KCl 2,4 M) inoculadas a 0,1 DO₆₀₀/ml a partir de un precultivo de una noche en YPD. El tamaño de la población celular, los metabolitos extracelulares y la viabilidad se siguieron durante 7 días. Los ensayos se realizaron por triplicado. La viabilidad se determinó usando un citómetro de flujo (Accuri, BD Biosciences) para contar 20 000 células diluidas y lavadas en 1x PBS 300 µl (NaCl 137 mmol/l (Sigma-Aldrich), KCl 2,7 mmol/l, Na₂HPO₄ 100 mmol/l (Sigma), KH₂PO₄ 2 mmol/l (Sigma), pH 7,5) con 3 µl de yoduro de propidio (Calbiochem) previamente diluido a 0,1 mg/ml en agua estéril.
- 10

15 *Métodos analíticos.* Las densidades celulares se determinaron midiendo la DO₆₀₀ con un Secomam UVILine 9400 o usando un contador celular Coulter ZBI conectado a un C56 Channelyzer provisto de una sonda con una apertura de 100 mm (Beckman Coulter). El peso seco se determinó gravimétricamente filtrando 10 ml de muestra (tamaño de poro 0,45 µm, Millipore) y secando la muestra durante 24 h a 100 °C. Las concentraciones de glucosa extracelular, glicerol, etanol, piruvato, succinato y acetato se determinaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), usando una columna de exclusión iónica HPX-87H (Bio-Rad). Los compuestos volátiles (acetoína y 2,3-butanodiol) se analizaron mediante cromatografía de gases (GC). La acetoína y el butanodiol se extrajeron en cloroformo de acuerdo con el protocolo Hagenauer-Hener con las siguientes modificaciones: se añadió 1 ml de hexanol (Sigma) como patrón interno (1:1000 v/v) en etanol al 10 % (VWR) a 1 ml de muestra. La fase orgánica se secó y se inyectó 1 µl en una columna megabore de 30 m (DBWAX, JandW Scientific) en un aparato GC HP 6890. Las concentraciones de acetaldehído se determinaron enzimáticamente de acuerdo con el método de Lundquist. Para experimentos a escala piloto, las concentraciones de glucosa y fructosa se determinaron enzimáticamente. La concentración de etanol se determinó mediante la medición de la densidad, la acidez volátil mediante el método del azul de bromofenol, la concentración de SO₂ mediante yodometría y la acidez total mediante valoración. La osmolalidad se midió usando un dispositivo Vapro 5520 (Wescor) con un volumen de muestra de 10 µl.

20

25

30 *Evolución adaptativa en medio KCl hiperosmótico y aislamiento de cepas evolucionadas con alta producción de glicerol.* Para evolucionar la cepa EC1118, se realizaron cultivos discontinuos en YPD al 8 % de glucosa con un aumento gradual del estrés osmótico. Se eligió el estrés por KCl porque genera estrés osmótico y salino pero, a diferencia del NaCl, no provoca toxicidad por cationes. Se usó una concentración de azúcar elevada (8 %) para mantener un buen rendimiento fermentativo de la cepa evolucionada en un medio rico en azúcar. En experimentos preliminares, se probó el efecto de diversas concentraciones de KCl sobre el crecimiento de EC1118 y se observó que la adición de KCl 1,25 M en YPD al 8 % de glucosa reducía cuatro veces el crecimiento de EC1118 (datos no mostrados). Los experimentos de evolución adaptativa en laboratorio (ALE) se iniciaron en YPD 8 % glucosa que contenía KCl 1,25 M. La osmolalidad de este medio es de 2 105 mmol/kg, en comparación con 480 mmol/kg para YPD con 8 % de glucosa. Las concentraciones de KCl se aumentaron progresivamente hasta 2,4 M, correspondiente a una osmolalidad de 3730 mmol/kg y se mantuvo en ese nivel a partir de entonces. Se realizaron experimentos ALE por duplicado para cada condición y se efectuó un experimento ALE de control, sin estrés osmótico.

35

40

45 Las muestras recogidas después de 100, 200, 300 y 400 generaciones se analizaron primero para monitorizar la dinámica de cada experimento de evolución. Las células de levadura se sembraron en YPD y las poblaciones obtenidas se caracterizaron durante la fermentación del mosto sintético MS210 a 28 °C. La concentración de glicerol en el medio de cultivo se midió al extremo de la fermentación como primer indicador del éxito o fracaso de la adaptación. La adaptación en medio KCl generó poblaciones evolucionadas con una mayor producción de glicerol durante la fermentación del vino (Figura 1), mientras que no se observó ningún aumento de glicerol en el experimento de control (evolución de EC1118 sin estrés). Se observó un aumento similar en la producción de glicerol en los dos experimentos paralelos con KCl (a) y (b). En fermentaciones con ambos linajes (a) y (b), la concentración de glicerol producido por fermentación alcanzó 12 g/l para las poblaciones evolucionadas a 200 generaciones; el valor para EC1118 ancestral era 8,5 g/l. El experimento KCl-ALE se llevó a cabo durante 450 generaciones (duración total de casi 2 años), pero solo se observó una pequeña variación en la producción de glicerol después de 200 generaciones (datos no mostrados).

50

55 *Primera caracterización de las cepas evolucionadas durante la fermentación del vino.* Después de varias generaciones, debido a la acumulación natural de mutaciones, una población no homogénea de levaduras debe estar presente en las muestras obtenidas a partir de experimentos de ALE. Las poblaciones de levaduras muestreadas tras diferentes tiempos del experimento KCl-ALE se subcultivaron en YPD. Estos subclones, en lo sucesivo en el presente documento denominadas cepas evolucionadas, se caracterizaron durante la fermentación del vino en medio MS210 (Figura 1). Todas las cepas evolucionadas obtenidas después de 200 generaciones producían más glicerol que la cepa ancestral; la producción de glicerol se mantuvo estable después de 200 generaciones. Consistente con la reconducción de carbonos y la oxidación de NADH resultante del aumento de la producción de glicerol, todas las cepas evolucionadas mostraron un rendimiento de etanol reducido. El rendimiento de etanol fue entre 0,440 y 0,450 para las cepas evolucionadas y 0,464 para la cepa ancestral de referencia (Figura 1 A y B). Los mutantes evolucionados mostraron un consumo reducido de azúcar (Figura 1 C y D). Por lo tanto, había una correlación entre alto rendimiento de glicerol, rendimiento de etanol reducido y propiedades fermentativas reducidas. Se llevó a cabo un estudio detallado

60

65

de seis cepas evolucionadas por KCl a partir de poblaciones aisladas después de 200, 250 y 300 generaciones, incluyendo tres del linaje (a): K200.1(a), K250.1(a), K300.2(a) y tres de linaje (b): K200.1(b), K250.3(b), K300.1(b). La cepa de levadura K300.1(b) (también denominada Lowa3 en el presente documento) se registró en el CNCM I-4684 como un depósito biológico en la Collection National de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Instituto Pasteur el

5 18 de octubre de 2012. La cepa de levadura K250.3(b) (también denominada Lowa2 en el presente documento) se registró en el CNCM I-4685 como un depósito biológico en la Collection National de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Instituto Pasteur el 18 de octubre de 2012.

10 *Las cepas con alta producción de glicerol sobreviven mejor en condiciones de estrés osmótico y restricción de carbono.*

15 La resistencia de las cepas evolucionadas al estrés hiperosmótico se evaluó mediante el crecimiento en KCl, NaCl o placas SD de sorbitol. En estas condiciones, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre EC1118 y las cepas evolucionadas (Figura 2): en las condiciones del experimento ALE (YPD 80 g/l de glucosa, KCl 2,4 M), la tasa específica de crecimiento y el número máximo de células alcanzados por las cepas evolucionadas eran similares a los de la cepa ancestral. Por lo tanto, las células de levadura que evolucionaron en estas condiciones no mostraron adaptación del crecimiento al estrés osmótico. A continuación se examinó si otros componentes de ajuste, tales como la viabilidad, se habían perfeccionado durante el experimento de evolución. La viabilidad de las células se monitorizó durante el cultivo que implicaba un ciclo de transferencia de 7 días en las condiciones del experimento de evolución (YPD 80 g/l de glucosa, KCl 2,4 M). Después del agotamiento completo de la glucosa (aproximadamente 4 días), los mutantes evolucionados sobrevivieron mejor que la cepa ancestral. Después de 7 días (correspondiente al momento 20 de transferir al medio fresco durante el experimento de evolución), casi todas las células EC1118 habían muerto, mientras que el número de células viables de los mutantes evolucionados era considerablemente mayor (Figura 2). La viabilidad de los mutantes evolucionados a los 7 días se correlacionó con la producción de glicerol en el mismo punto temporal (datos no mostrados). Por lo tanto, la principal adaptación a la presión selectiva ejercida sobre las 25 células de levadura durante el experimento de evolución adaptativa parece ser el perfeccionamiento de la supervivencia en condiciones de estrés salino y restricción de carbono.

30 *Caracterización de las cepas seleccionadas evolucionadas con KCl durante la fermentación del vino.* Se estudiaron detalladamente las características de las seis cepas seleccionadas evolucionadas por KCl y de la cepa ancestral durante la fermentación del vino en cultivos anaeróbicos discontinuos en medio MS. Todas las cepas fueron capaces de completar la fermentación, aunque la duración de la fermentación difiere entre las cepas evolucionadas (Tabla 1).

35 Dos cepas evolucionadas, K200.1(b) y K300.1(b), consumieron todo el azúcar en menos de dos semanas, como la cepa ancestral, mientras que se necesitó un mes o más para las otras cuatro cepas evolucionadas (el azúcar se agotó completamente solo después de 40 días en K250.1(a) y K300.2(a)).

40 La tasa de fermentación de dos cepas evolucionadas que tienen una capacidad de fermentación distinta, K300.2(a) y K300.1(b), se muestra en la Figura 3A. Las cepas evolucionadas presentaron una disminución general del rendimiento fermentativo en comparación con la cepa ancestral, lo que concuerda con la reducción del consumo de azúcar observada anteriormente, pero, no obstante, pudieron completar la fermentación. La población celular final fue la misma entre las cepas ancestrales y estas dos cepas evolucionadas, a pesar de que K300.2(a) mostró un crecimiento más lento que K300.1(b) (Figura 3B).

45 La concentración de los subproductos más abundantes se determinó después de 30 días de fermentación (Tabla 1). Los equilibrios de carbono y redox se aproximan al 100 % en todas las cepas. Todas las cepas evolucionadas produjeron glicerol en concentraciones entre un 48 y un 67 % superiores a las producidas por EC1118, y el contenido de etanol en los vinos sintéticos fue entre un 0,45 y un 0,80 % (v/v) inferior. Las cepas evolucionadas también producían mayores cantidades de succinato, 2,3-butanodiol y acetaldehído que la cepa ancestral. La producción de succinato por K200.1(a) y K300.2(a) fue un 22 % y un 88,9 % más alta, que por EC1118; la producción de acetaldehído por K200.1(a) y K300.2(a) fue entre un 45,5 % y un 181,8 % más alta, respectivamente, y la de 2,3-butanodiol entre un 93 % y un 255,6 % más alta. La concentración de estos compuestos también aumentó en las cepas que 50 sobreexpresaban *GPD1* que codifica la glicerol 3-P deshidrogenasa, en que el flujo de carbono se redirige hacia la formación de glicerol a expensas del etanol (Michnick *et al.*, Remize *et al.*, Cambon *et al.*). Por el contrario, a diferencia de las cepas modificadas por ingeniería genética descritas anteriormente, no se observaron cambios significativos en la producción de acetato y acetoína por las cepas evolucionadas.

55 Aunque se observaron fenotipos similares en las dos réplicas, el linaje (b) se caracterizó por una producción de glicerol ligeramente superior y mejores rendimientos fermentativos. K300.1(b) fue la cepa evolucionada más prometedora obtenida en términos de capacidad de fermentación y producción de glicerol, succinato, 2,3-butanodiol y etanol.

60 *Propiedades metabólicas de la cepa evolucionada K300.1(b) a distintas temperaturas en mostos de uva sintéticos y naturales.* El vino puede producirse en un amplio intervalo de temperaturas de fermentación, habitualmente de 16 °C (para vinos blancos) a 28 °C y más (para vinos tintos). Se compararon las propiedades metabólicas de la cepa ancestral y de la cepa evolucionada K300.1(b) en un amplio intervalo de temperaturas (16, 20, 24, 28, 32 y 34 °C) en medio MS210 con 260 g/l de azúcares. Para temperaturas entre 16 y 28 °C, ambas cepas consumieron la totalidad o la mayor parte del azúcar, mientras que para las dos temperaturas más altas, se observó una concentración de azúcar residual de 43 y 53 g/l para EC1118 y de 47 y 59 g/l para K300.1(b) a 32 y 34 °C respectivamente.

Los rendimientos de los subproductos se determinaron después de 30 días de fermentación (Figura 4). A todas las temperaturas, K300.1(b) se diferenció claramente de EC1118 basándose en los rendimientos de glicerol altos, de succinato altos y de etanol bajos. Los rendimientos de glicerol y succinato aumentaron al aumentar la temperatura, mientras que el rendimiento de etanol disminuyó. Las diferencias entre temperaturas fueron mayores para K300.1(b) que para EC1118, en particular para las tres temperaturas más altas. El contenido de etanol se redujo en un 0,14 % (v/v), un 0,18 % (v/v) y un 0,24 % (v/v) a 16 °C, a 20 °C y a 24 °C y en un 0,61 % (v/v), un 0,80 % (v/v), un 0,87 % (v/v) a 28 °C, a 32 °C y a 34 °C respectivamente con la cepa evolucionada en comparación con EC1118. Por lo tanto, se observó un cambio metabólico entre 24 °C y 28 °C. Para examinar si puede observarse un comportamiento similar en el mosto natural, la fermentación se realizó en Chardonnay-Coursan, en condiciones similares, a 24 °C y 28 °C. En estas condiciones, el nivel de etanol se redujo un 0,12 % (v/v) a 24 °C y un 0,42 % (v/v) a 28 °C, confirmando los resultados obtenidos en el mosto sintético. Estos resultados ponen de relieve un metabolismo más flexible en la cepa evolucionada con respecto a la temperatura, con la reducción del rendimiento de etanol maximizada a una temperatura de 28 °C y superior.

Tabla 1. Reducciones, evoluciones de carbono y radios y metabolitos de fermentación para EC1118 y cinco condicioneadas mediante 30 días de fermentación en MS21C, ácidos 2009 y 28 °C.

	EC1118	K250 (A)	K250 (B)	K250 (C)	K250 (D)	K250 (E)
Componentes principales (%)						
glucosa consumida	99.935,1	298.351,3	281.734,5	261.345,0	281.060,1	258.881,3
CO ₂	1.1350	1.124,4	1.084,4	1.024,4	1.122,2	1.094,1
metanosa (60 %) ^a	4.020,1	3.645,1	4.550,2	3.746,2	3.660,2	4.386,1
etanol	122.645,6	118.231,3	112.841,5	113.221,0	115.331,4	114.280,6
3-hidroxipropano	8.530,1	7.230,1	12.730,1	12.830,2	13.340,5	13.240,3
2-hidroxipropano	0.290,6	1.620,1	1.540,1	1.460,1	1.560,1	1.760,1
glicerol	0.2956,03	0.2936,95	0.2836,91	0.2836,90	0.2836,91	0.2836,92
acetato	0.344,2	0.140,0	0.845,0	1.145,0	1.365,2	1.365,3
2,3-butanodiol ^b	0.01146,9021	0.01666,9321	0.02366,9322	0.02512,9325	0.02512,9326	0.02512,9329
acetonato	6,4	13,200,69	13,200,69	13,200,69	13,200,69	13,200,69
2,3-butanotetrol ^c	2.34951,02	1.3620,69	0.8949,39	1.0856,34	0.9726,11	1.1060,18
Espectro de carbonos (%)						
Espectro de carbonos (%)						
glucosa media (%)	97.425,6	96.225,8	97.242,5	97.692,7	96.342,8	96.782,9
Yield (%)	6.45345,022	6.45290,504	6.45290,504	6.45290,504	6.45290,504	6.45290,504
Yield media (%)	6.45345,022	6.45290,505	6.45290,505	6.45290,505	6.45290,505	6.45290,505
Yield media (95%)	7.01215,027	11.3240,68	11.2120,71	11.3949,23	11.3849,40	12.3140,28
etanol ^d (%)	16.2858,98	19.6230,13	14.5660,32	19.8420,34	14.7420,59	14.5230,98
gliceroles (2) media absoluto (%)	17.0265,97	17.5963,28	17.4530,73	17.5231,23	17.6741,40	17.5231,27
acetato media (%)	6.1361,1	20.221,4	58.744,5	30.546,0	0.140,4	22.581,8
2,3-butanodiol media (%)	5.1161,1	1.581,4	0.342,6	0.342,4	1.42,5	0.142,3

^a El espectro de carbonos representa la relación entre los totales de carbono de los subproductos de la fermentación y los totales de carbono de la glucosa. Ambas expresiones se expresan en porcentaje.

^b El espectro media es la media entre el 95% de reducción de los subproductos de la fermentación y el 95% de reducción de los subproductos de la glucosa.

^c Biomasa media de 80 % de actividad de la fermentación.

^d Etanol absoluto de 15.936.

^e Metano absoluto de 30.936.

^f Metano absoluto de 30.936.

Evaluación a escala piloto de la cepa evolucionada K300.1(b). Para validar los resultados obtenidos a escala de laboratorio, se compararon el comportamiento y las propiedades metabólicas de K300.1(b) y EC1118 durante la fermentación a escala piloto, usando un mosto de uva garnacha, a 28 °C (Tabla 2).

- 5 Tabla 2. Características de los vinos obtenidos por fermentación de mosto de garnacha con EC1118 y K300.1(b) a escala piloto (1 hl). ASV se determinó por destilación y densitometría electrónica.

	EC1118	K300.1(b)
azúcares residuales (g/l)	0,2	0,5
acidez volátil (g/l)	0,50	0,36
acidez total (g/l)	4,10	4,40
ASV % (v/v)	16,26	15,80
pH	3,60	3,57
SO ₂ libre (g/l)	0,07	0,07
SO ₂ total (g/l)	0,035	0,039
acetaldehído (g/l)	0,021	0,030
malato (g/l)	1,35	1,38
succinato (g/l)	1,04	1,43
acetato (g/l)	0,47	0,31
glicerol (g/l)	10,8	14,2

- 10 Para acercarse lo más posible a las condiciones industriales, las cepas K300.1(b) y EC1118 se usaron en forma de levadura seca activa y se inocularon tras un procedimiento convencional de rehidratación. Para evitar que se atasque la fermentación, se añadieron oxígeno y nitrógeno durante la fermentación (Figura 5). La cepa evolucionada tenía una tasa de fermentación ligeramente menor que EC1118, pero pudo completar la fermentación, a pesar de la elevada concentración de azúcar (270 g/l). La cepa evolucionada produjo más glicerol (14,2 g/l frente a 10,8 g/l) y succinato que EC1118, y menos etanol, dando como resultado una reducción del 0,46 % (v/v) del contenido de etanol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a escala de laboratorio. La producción de ácido acético y acidez volátil por la cepa evolucionada fue claramente inferior a la de EC1118. La producción de ácido acético de ambas cepas fue muy inferior a la del mosto sintético, lo que concuerda con observaciones anteriores. En resumen, los resultados obtenidos en mosto de uva a escala piloto confirman la reprogramación metabólica de la cepa evolucionada y el análisis del vino obtenido no reveló efectos secundarios adversos.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- En este estudio, se usó la evolución adaptativa de laboratorio (ALE) para desarrollar levaduras vínicas de bajo contenido alcohólico reorientando el metabolismo de la cepa EC1118 hacia el glicerol. Los cultivos de levadura se transfirieron en serie en condiciones hiperosmóticas durante 450 generaciones usando KCl como sal de estrés osmótico y salino. El estrés impuesto fue grave, desde osmolalidades de 2 105 a 3 730 mmol/kg. Estos niveles de estrés son superiores a los usados generalmente en condiciones de laboratorio para estudiar las respuestas al estrés osmótico (glucosa 20 g/l, NaCl 1,2 M, correspondiente a una osmolalidad de 2 070 mmol/kg). El estrés por KCl generó cepas en las que el flujo de carbono se reorientó hacia el glicerol. En otro experimento, se usó sorbitol como sal osmótica (de 1,5 a 2,4 g/l, lo que corresponde a 1 480 a 2 105 mmol/kg), pero estas condiciones no lograron generar cepas con una mayor producción de glicerol (datos no mostrados). Esta clara diferencia en el efecto puede ser consecuencia de las diferentes naturalezas de la sal de estrés (sal frente a estrés osmótico), y/o el mayor nivel de estrés en el experimento KCl-ALE que en el experimento sorbitol-ALE. Las cepas evolucionadas obtenidas a partir del experimento KCl-ALE no fueron más resistentes que la cepa ancestral al estrés osmótico o salino, pero mostraron una ganancia de aptitud debido a una mejor viabilidad en condiciones de estrés salino e inanición de carbono, las condiciones en las cuales las células se transferían a un medio fresco. No se observó un aumento de la producción de glicerol en el experimento de control de ALE con EC1118 sin estrés de KCl (datos no mostrados). Por lo tanto, es probable que la reorientación de los flujos de carbono hacia el glicerol se debiera a la combinación de una elevada concentración de KCl y de estrés por inanición de carbono.
- El vínculo entre la supervivencia y el glicerol es intrigante. Habitualmente, las células mueren cuando el cultivo entra en la fase estacionaria, cuando falta uno o todos los nutrientes. Sin embargo, si el único nutriente que falta es la fuente de carbono, las células sobreviven más tiempo. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se estipula que, en limitación de carbono, la detección de nutrientes depende de las proteínas Sch9, Tor y Ras que se activan y convergen en la proteína quinasa Rim 15; Rim 15 regula los factores de transcripción Msn4/Msn2 y Gis1, implicados en la protección celular y la longevidad, también llamada duración cronológica de la vida (CLS, por sus siglas en inglés). Trabajos recientes indican que la producción de glicerol es necesaria para la regulación de la CLS, y se han sugerido varios mecanismos distintos. A diferencia de la glucosa y el etanol, el glicerol no inhibe la transactivación de Msn2/Msn4 y Gis1, que desempeñan un papel importante en la resistencia general al estrés y la longevidad. Sin embargo, la producción de glicerol puede afectar al envejecimiento a través de la modulación del equilibrio redox

intracelular, porque su producción contribuye al mantenimiento de la relación NAD⁺/NADH. También se demostró que la sobreexpresión de la lanzadera malato-aspartato NADH prolongaba la CLS. También, se ha postulado que una osmolaridad elevada alarga la vida activando Hog1, provocando un aumento de la biosíntesis de glicerol a partir de intermedios glucolíticos. También se han destacado los vínculos entre el envejecimiento y el metabolismo redox durante la fermentación del vino.

La caracterización detallada de los mutantes evolucionados con KCl durante la fermentación del vino reveló que las cepas evolucionadas habían sufrido cambios sustanciales en su metabolismo central del carbono: los carbonos en estas cepas se redirigen principalmente hacia glicerol, succinato y 2,3-butanodiol a expensas del etanol. La ausencia de fenotipo de resistencia al estrés y el perfeccionamiento en condiciones de restricción de carbono y de estrés sugieren que el objetivo principal de la evolución no es la ruta HOG. El origen del fenotipo observado podría basarse en mutaciones indirectas que alteran el equilibrio redox, provocando una redirección del flujo de carbono. Otros factores, tales como una menor tasa de absorción de glucosa, también podrían desempeñar un papel en el fenotipo. De hecho, el flujo neto a través del ciclo TCA aumentó significativamente con la disminución de la captación de glucosa, lo que recuerda la mayor producción de succinato y la menor tasa de fermentación en las cepas evolucionadas. Por otro lado, anteriormente se demostró que la producción de glicerol depende menos de la tasa de absorción de glucosa y más de las condiciones ambientales. Para dilucidar los mecanismos subyacentes pueden ser necesarios otros estudios que usan enfoques que abarquen todo el genoma.

Como se ha observado anteriormente en cepas modificadas por ingeniería genética que sobreexpresan *GPD1* (Michnick *et al.*, Remize *et al.*, Cambon *et al.*), el aumento de la producción de glicerol se asocia a una reducción de la síntesis de etanol debido a la menor disponibilidad de carbono y a la escasez de NADH, y esto va acompañado de perturbaciones en los nodos de acetaldehído y piruvato. Por ejemplo, las cepas que sobreexpresan *GPD1*, y producen grandes cantidades de glicerol pero bajos niveles de etanol, acumulan succinato y 2,3-butanodiol pero también compuestos no deseables incluyendo acetaldehído, acetato y acetoína (Remize *et al.*, Cambon *et al.*). La cepa evolucionada descrita en el presente documento no acumuló niveles elevados de estos compuestos, posiblemente debido, por ejemplo, al menor aumento de la producción de glicerol que en las cepas modificadas por ingeniería genética y/o a una estrategia metabólica diferente. En levaduras, la acetoína se reduce a 2,3-butanodiol por la 2,3-butanodiol deshidrogenasa. Anteriormente se demostró que el equilibrio entre la acetoína y el 2,3-butanodiol en las cepas modificadas por ingeniería genética puede verse influido por las cantidades de glicerol producidas. En cepas que producen altos niveles de glicerol, la acetoína se acumuló debido a la capacidad limitada de la 2,3 butanodiol deshidrogenasa y a la menor disponibilidad de NADH, ya que este cofactor se reoxida principalmente a través de la síntesis de glicerol. En un estudio anterior (Michnick *et al.*), se descubrió que las cepas que sobreproducen glicerol a niveles moderados (tales como *W18GPD1* o *W6GPD1*), comparables a los mutantes evolucionados caracterizados en el presente documento, no acumularon acetoína. Como las cepas evolucionadas, estas cepas también acumulaban acetaldehído a niveles bajos, que puede explicarse por una limitación de la alcohol deshidrogenasa. Estos niveles se mantienen en el intervalo de concentraciones habituales en los vinos y es improbable que provoquen un problema sensorial. En cambio, la menor acumulación de acetato por parte de los mutantes evolucionados es sorprendente porque hubo acumulación de acetato en todos los casos, independiente del nivel de glicerol acumulado por las cepas *GPD1* (Blomberg *et al.*). Esto sugiere que las modificaciones de la red metabólica en los mutantes evolucionados difieren de las de las cepas modificadas genéticamente. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, otra diferencia importante tiene que ver con los rendimientos fermentativos comprometidos de las cepas evolucionadas, lo que sugiere que las mutaciones responsables del desvío del metabolismo en estas cepas también afectan negativamente a la tasa glucolítica. Este descubrimiento contrasta con el perfeccionamiento del rendimiento fermentativo de las cepas *GPD1* durante la fase estacionaria de la fermentación del vino.

Así pues, se plantea la hipótesis de que la evolución adaptativa dio lugar a la utilización de rutas diferentes a las que funcionan en las cepas modificadas por ingeniería genética racionalmente. La presente divulgación proporciona la primera descripción de una estrategia no OMG que permite un aumento sustancial de la producción de glicerol y una disminución del rendimiento de alcohol de una cepa comercial de levadura de vino. Se obtuvo una desviación de carbono mucho mayor en comparación con intentos anteriores de desviar carbonos hacia la ruta de las pentosas fosfato o hacia el glicerol mediante evolución adaptativa usando sulfitos (Kutyna *et al.*). En consecuencia, la reducción del contenido de etanol en el vino producido con nuestras cepas fue de al menos el 0,5 % (v/v) a partir de 260 g/l de azúcares. A pesar de los menores rendimientos fermentativos de las cepas evolucionadas, se seleccionaron aislados evolucionados con una cinética de fermentación solo ligeramente afectada. Una primera evaluación del valor potencial de la cepa evolucionada K300.1(b) para la vinificación reveló características similares en mostos de uva sintéticos y naturales, excepto que la producción de acetato se redujo en los vinos obtenidos a partir de mostos de uva. De forma interesante, la cepa evolucionada K300.1(b) tiene una mayor flexibilidad metabólica que la cepa ancestral con respecto a la temperatura, siendo mayores las diferencias metabólicas entre las dos cepas a temperaturas superiores a 24 °C. Esto sugiere que la cepa evolucionada podría ser particularmente útil para la producción de vinos tintos, que se producen habitualmente en un intervalo de temperatura de 25-30 °C y son los más afectados por los niveles excesivos de alcohol.

El presente ejemplo demuestra que la estrategia de evolución adaptativa usada en el presente documento es una alternativa valiosa a la modificación por ingeniería genética racional para la generación de levadura no OMG de baja producción de etanol. Aunque el desvío de flujo de carbono obtenido no es tan elevado como el logrado por la

ingeniería genética, una reducción del contenido de alcohol del vino entre el 0,5 y el 1 % (v/v) ofrece perspectivas interesantes. Una cata preliminar realizada por un panel de siete expertos en vino no reveló ningún defecto de los vinos producidos a escala piloto, confirmando los buenos atributos generales de las cepas evolucionadas de las que se informa en este estudio.

5 EJEMPLO II: SEGUNDA GENERACIÓN DE LEVADURAS DE BAJA PRODUCCIÓN DE ETANOL OBTENIDAS POR CRUZAMIENTO

10 La cepa *S. cerevisiae* K300.1(b) (obtenida y caracterizada en el Ejemplo I y renombrada Lowa3 en el Ejemplo II) se cultivó (2 días a 28 °C) en un medio GNA de presporulación (extracto BactoLevadura al 1 %, BactoPeptona al 2 %, glucosa al 20 %, agar al 2 %). La cepa Lowa3 se transfirió a continuación a un medio de esporulación spoMA (Extracto BactoLevadura al 0,1 %, glucosa al 0,05 %, acetato potásico al 1 %, adenina al 0,002 %) y se cultivó entre 3 y 15 días a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) para producir ascas. Las ascas obtenidas se aislaron y se incubaron con el jugo digestivo del caracol *Helix pomatia* (dilución 1/6) durante 20 a 60 min a 28 °C. Las ascas se diseccionaron con un microscopio de disección (Singer MSM300) para aislar las esporas. Con este método, se aislaron aproximadamente 700 esporas.

15 Dado que la cepa EC1118 de *S. cerevisiae* y la cepa Lowa3 son heterocigotas para el gen *HO*, se espera que la mitad de la progenie sea haploide, mientras que la otra mitad de la progenie será diploide. Como tal, se realizó una selección por PCR para seleccionar la progenie haploide (por ejemplo, *HO*^{+/−}) de la cepa Lowa3. La PCR se realizó con una parte de una colonia diluida en 50 µl de agua estéril y se calentó durante 10 min a 95 °C para liberar el ADN. Cinco (5) µl de la mezcla acuosa de ADN se mezclaron con tampón Taq 10x (con (NH₄)₂SO₄; 2,5 µl), MgCl₂ 25 mM (2,5 µl), dNTP 10 mM (0,5 µl), el cebador MAT-F (1 µl), el cebador MATa-R o MATalpha-R (1 µl), polimerasa Taq (Fermentas, 0,25 µl) y agua para obtener un volumen final de 25 µl. Los siguientes oligonucleótidos se usaron para distinguir entre los genes MATa y MATalpha: Mat F (5'-AGTCACATCAAGATCGTTATGG-3') (SEQ ID NO: 1), Mat a-R (5'-ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTG-3', generando un amplicón de 504 pb del gen MATa) (SEQ ID NO: 2) y Mat alpha-R (5'-GCACGGAATATGGGACTACTTCG-3', generando un amplicón de 404 pb del gen MATalpha) (SEQ ID NO: 3). La PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos usando una temperatura de desnaturalización de 94 °C (durante 1 min), una temperatura de hibridación de 55 °C (durante 1 min) y una temperatura de elongación de 72 °C (durante 1 min).

20 30 Usando la selección por PCR, se obtuvieron 156 esporas haploides de la cepa Lowa3. El fenotipo de las esporas haploides se caracterizó también durante la fermentación del vino. Se realizaron varias fermentaciones vínicas en fermentadores de 330 ml que contenían 300 ml de mosto sintético (MS425, 260 g/l de glucosa) en agitación. Después de 15 y 30 días de fermentación a 28 °C, se obtuvo una muestra del sobrenadante para determinar la concentración de glicerol. Las diferentes cepas haploides se clasificaron en función de su producción de glicerol (que es inversamente proporcional a su producción de etanol). La mejor cepa del tipo de cruzamiento MATa, llamada 5074, produjo 20,9 g/l de glicerol. La mejor cepa del tipo de cruzamiento MATalpha, llamada 5049, produjo 16,2 g/l de glicerol. Las cepas 5074 y 5049 se seleccionaron para su posterior cruzamiento.

35 40 Ambas cepas se cultivaron en fase de crecimiento y se pusieron en contacto en un medio YPD (extracto de BactoLevadura al 1 %, BactoPeptona al 2 %, glucosa al 2 %, agar al 2 %). Se obtuvo un primer híbrido, llamado VT1 (híbrido de generación H1). La naturaleza diploide del híbrido VT1 se confirmó por la ausencia de cruzamiento cuando se puso en contacto con una cepa del tipo de cruzamiento MATa y con una cepa del tipo de cruzamiento MATalpha.

45 50 Las esporas de la cepa híbrida VT1 se generaron con el medio GNA y spoMA como se ha descrito anteriormente. Una espora haploide estable de la cepa híbrida VT1, denominada MP120-A4 se seleccionó en función de su tipo de cruzamiento MATalpha. La cepa MP120-A4 se cruzó con la cepa 5074 para obtener la cepa MP112-A5 (híbrido de generación H2). La cepa MP112-A5 (también denominada H2) se registró en el CNCM I-4832 como un depósito biológico en la Collection National de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Instituto Pasteur el 9 de enero de 2014.

55 Las diversas cepas obtenidas se caracterizaron también por que fermentan el vino a escala de laboratorio o a escala piloto, como se describe en el Ejemplo I, y siguiendo la cinética de cada fermentación.

60 55 *Ensayo de fermentación N1.* Se ha usado un mosto sintético que tiene una concentración inicial de azúcar de 235 g/l (117,5 g/l de glucosa y 117,5 g/l de fructosa). La concentración inicial de nitrógeno disponible en este mosto sintético era de 300 mg/l. Todas las fermentaciones se realizaron en condiciones isotérmicas a 28 °C, en fermentadores de 1,1 l.

65 60 Como se muestra en la Figura 6, 112-A5 (H2) se comparó con EC1118 para fermentar el mismo mosto con un 14 % v/v de alcohol potencial. Como se ha descrito anteriormente, los perfiles cinéticos de fermentación son muy diferentes en la fase exponencial con una mejor tasa de fermentación de EC1118. La cepa de levadura evolucionada (112-A5) tenía una fase estacionaria larga y completó la fermentación mucho más tarde que la EC1118. Sin embargo, la fermentación se fue hacia sequedad, lo que significa que no hay azúcares residuales. Esto se confirma mediante el análisis en la Tabla 4. El uso de 112-A5 permitió fermentar con un nivel de etanol final significativamente inferior. Otra diferencia se observa en el contenido final de acetato que es significativamente inferior con 112-A5. Las diferencias

adicionales entre las fermentaciones obtenidas usando las cepas EC1118 o 112-A5 se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de diversos constituyentes del vino fermentado obtenido en el ensayo de fermentación N1 usando las cepas EC1118 o 112-A5. No se determinó el contenido de glicerol.

5

	Rendimiento de Azúcar/Etanol	ASV (% v/v)	Contenido de acetato (g/l)	Azúcares residuales (g/l)
EC1118	16,67	14,09	0,66	< 0,4
112-A5	17,5	13,45	0,5	< 0,4

Ensayo de fermentación N2. Se ha usado un mosto sintético que tiene una concentración inicial de azúcar de 260 g/l (130 g/l de glucosa y 130 g/l de fructosa). La concentración inicial de nitrógeno disponible en este mosto sintético era de 300 mg/l. Todas las fermentaciones se realizaron en condiciones isotérmicas a 28 °C, en fermentadores de 1,1 l.

10

Como se muestra en la Figura 7, 112-A5 (H2) se comparó con EC1118 para fermentar el mismo mosto con un 15,6 % v/v de alcohol potencial. Como se ha descrito anteriormente, los perfiles cinéticos de fermentación son muy diferentes en la fase exponencial con una mejor tasa de fermentación de EC1118. La cepa de levadura evolucionada (112-A5) tenía una fase estacionaria larga y completó la fermentación mucho más tarde que la EC1118. Sin embargo, la

15

fermentación se fue hacia sequedad, lo que significa que no hay azúcares residuales. Esto se confirma mediante el análisis en la Tabla 5. El uso de 112-A5 permitió fermentar con un nivel de etanol final significativamente inferior. Otra diferencia se observa en el contenido final de acetato que es significativamente inferior con 112-A5. Las diferencias adicionales entre las fermentaciones usando las cepas EC1118 o 112-A5 se presentan en la Tabla 5.

20

Tabla 5. Análisis de diversos constituyentes del vino fermentado obtenido en el ensayo de fermentación N2 usando las cepas EC1118 o 112-A5. No se determinó el contenido de glicerol.

	Rendimiento de Azúcar/Etanol	ASV (% v/v)	Contenido de acetato (g/l)	Azúcares residuales (g/l)
EC1118	16,7	15,56	0,68	0,4
H2	17,6	14,75	0,51	1,0

Ensayo de fermentación N3. En este ensayo piloto de fermentación se usó mosto de uva de la variedad Syrah. El mosto se pasteurizó rápidamente y se almacenó a 2 °C antes de la fermentación. Antes de la fermentación, el mosto de Syrah tenía las siguientes características: 255 g/l de azúcares totales, 3,50 g/l de H₂SO₄ de acidez total, pH = 3,63, 138 mg/l de nitrógeno disponible y una turbidez de 77 NTU. Antes de la fermentación y, como se indica en el Ejemplo I, las levaduras se rehidrataron. Además, durante la fermentación, el mosto se suplementó con oxígeno y nitrógeno (como se indica en el Ejemplo I). Todas las fermentaciones se realizaron en condiciones isotérmicas a 28 °C, en fermentadores de 1 hl. En lo sucesivo, los vinos se embotellaron.

La Figura 8 muestra la cinética fermentativa de EC1118, K300.1(b) (Lowa3) y 112-A5 (H2) en uvas reales, en condiciones enológicas. Los perfiles son diferentes pero los rendimientos en la duración total de la fermentación bastante similares, mostrando un retraso de solo 20 h para la fermentación con 112-A5. Esto confirma que 112-A5 es adecuada para fermentar uvas con alto contenido en azúcar hasta sequedad, sin atascos ni fermentaciones lentas. Esto se confirma por el análisis de los parámetros enológicos clásicos informados en la tabla 6A y 6B. El nivel final de etanol muestra una disminución de más del 1 % para el vino fermentado con 112-A5, con una mayor producción de glicerol y una producción de acetato muy baja (no detectada). Las diferencias adicionales entre las fermentaciones usando las cepas EC1118 o 112-A5 se presentan en las Tablas 6.

40

Tabla 6A. Parámetros cinéticos de la fermentación del vino usando las cepas EC1118 o 112-A5 en el ensayo de fermentación N3.

	Período de latencia (h)	Vmáx (g/l/h) después de la adición	Azúcares residuales (g/l)	Tiempo de ensayo de fermentación (h)
EC1118	11	2,13	0,3	130
112-A5	1	1,47	0,4	150

45

Tablas 6B. Análisis de diversos constituyentes del vino fermentado obtenido en el ensayo de fermentación N3 usando las cepas EC1118, las K300.1(b) o las 112-A5 (H2). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Compuestos principales (g/l)	EC1118	K300.1(b)	H2
azúcar consumido	254,6±0,1	254,5±0,0	254,7±0,2
etanol	118,4±1,2	113,6±0,9	107,8±0,8
glicerol	10,8±0,4	14,1±0,4	17,9±0,8
succinato	1,3±0,1	1,8±0,1	1,5±0,1
piruvato	0,13±0,01	0,16±0,01	0,15±0,01
acetato	0,5±0,1	0,1±0,0	nd
acetaldehído	0,016±0,008	0,021±0,001	0,020±0,006
acetoína	nd	nd	0,024±0,005
2,3-butanodiol	1,11±0,18	1,98±0,38	3,93±0,30
YEtOH	0,465±0,005	0,446±0,003	0,423±0,003
Yglicerol	0,042±0,002	0,055±0,000	0,070±0,003
Yglicerol/YEtOH (%)	9,09±0,34	12,37±0,05	16,57±0,84
etanol (%(v/v))	15,01±0,15	14,40±0,11	13,67±0,10
glucosa (g) para etanol al 1 %(v/v)	16,99±0,07	17,71±0,07	18,66±0,08

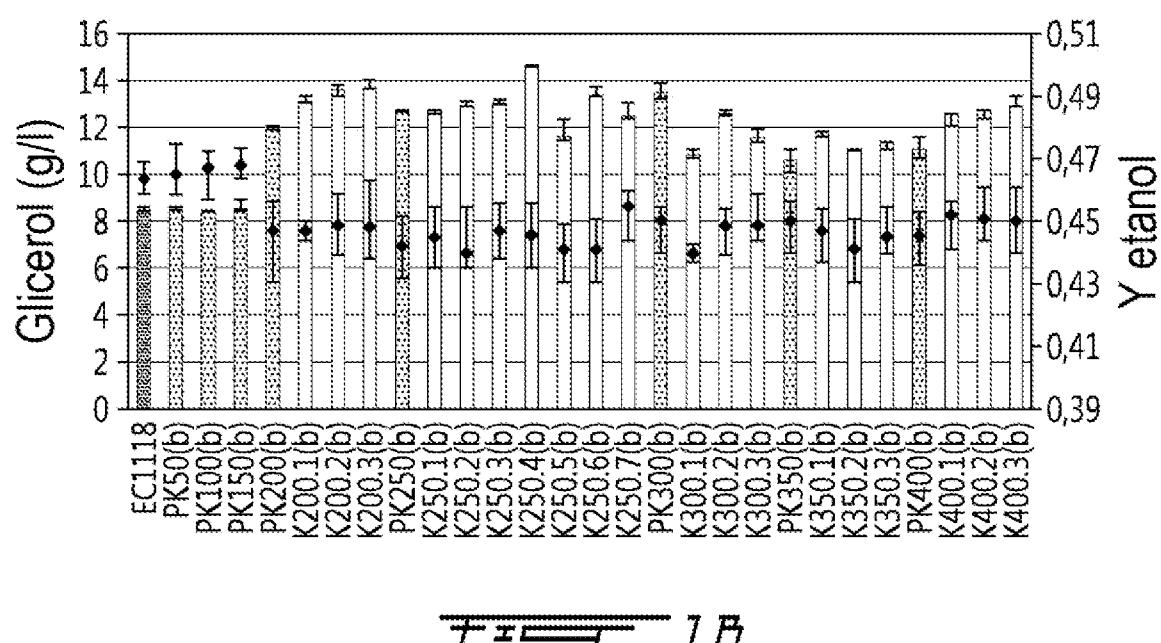
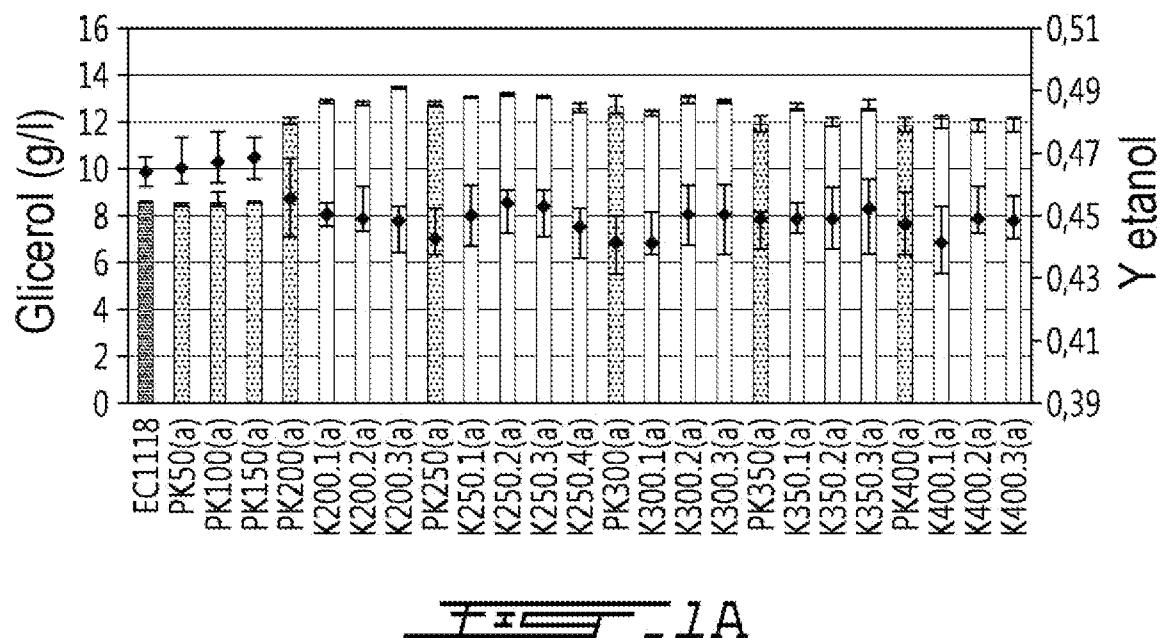
nd: no detectado (< 10 mg/ml)

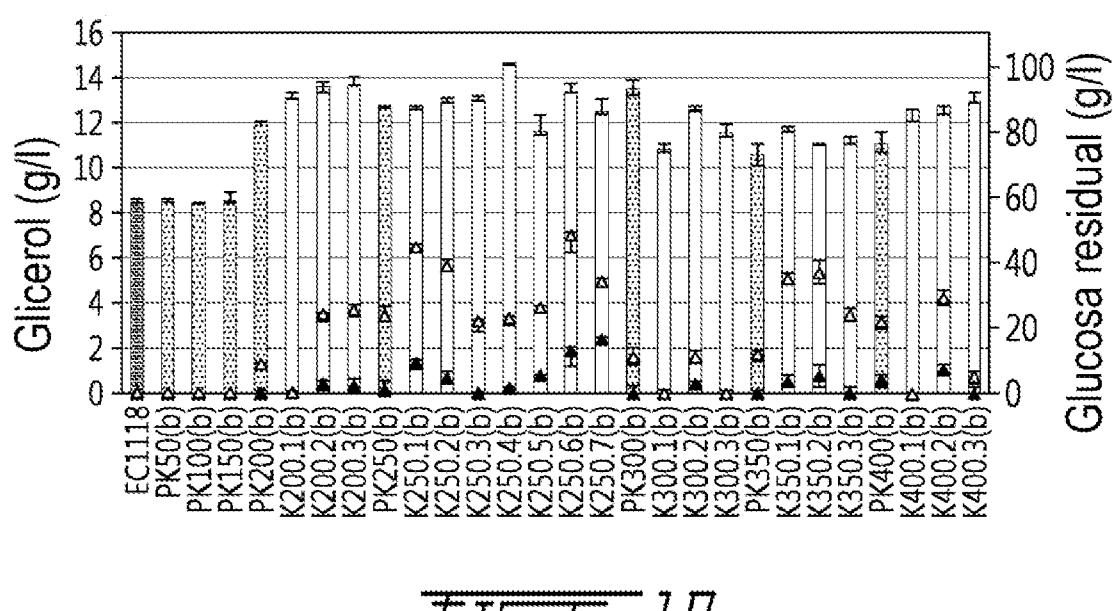
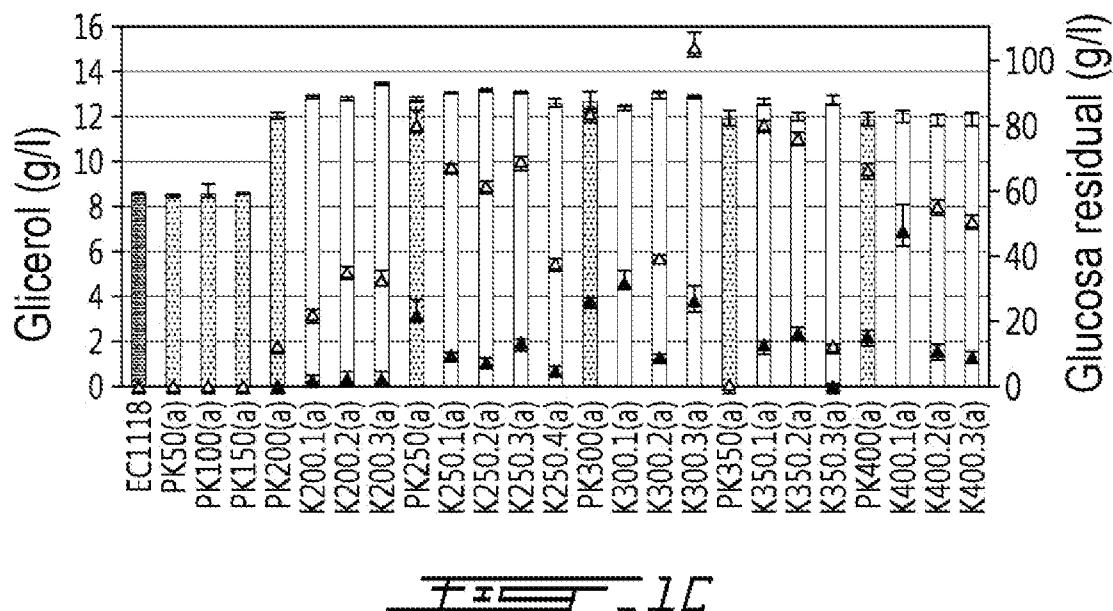
5 REFERENCIAS

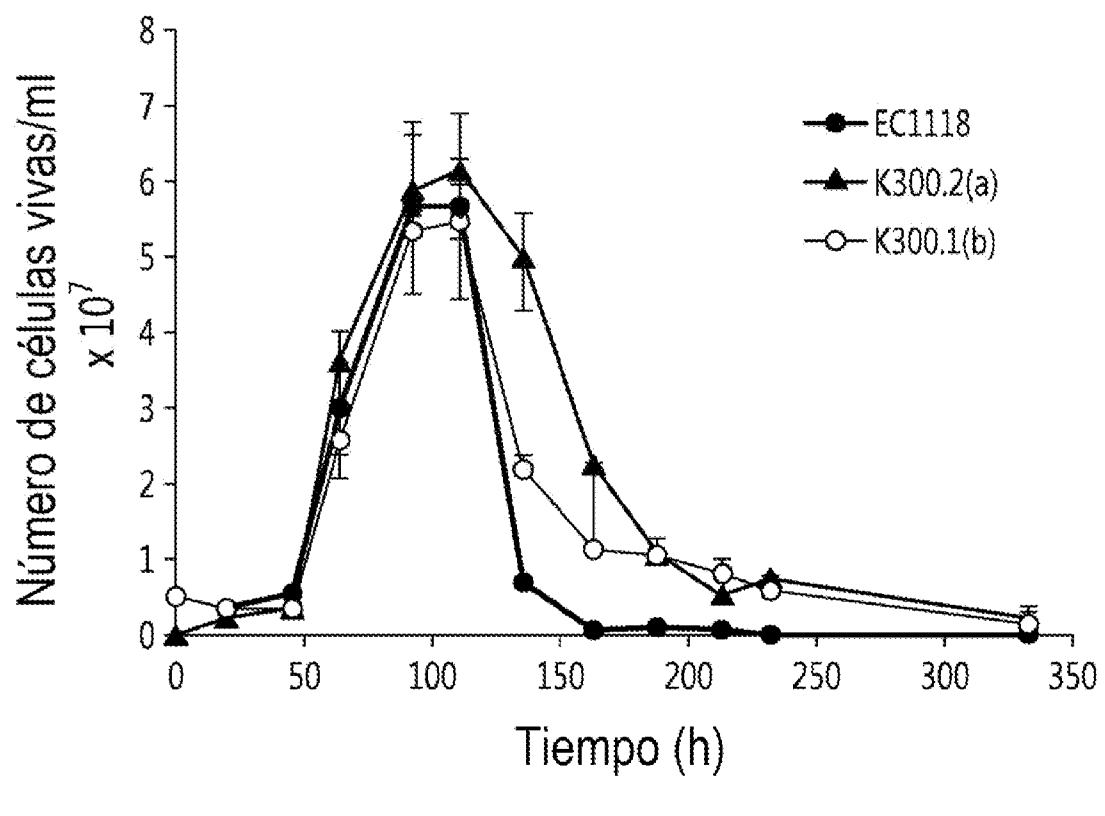
- Aguera E, Sablayrolles JM. Pilot scale vinifications (100L). III Controlled fermentation. Wine Internet Tech. J. 8.
- Bely M, Sablayrolles JM, Barre P. 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. J. Ferment. Bioeng. 70:246-252.
- Blomberg A, Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. Adv. Microb. Physiol. 33:145-212.
- 10 Cambon B, Monteil V, Remize F, Camarasa C, Dequin S. 2006. Effects of GPD1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. Appl. Environ. Microbiol. 72:4688-4694.
- 15 Hagenauer-Hener U, Henn D, Fettmar F, Mosandl A, Schmitt A. 1990. 2,3 Butanediol- Direkte Bestimmung der Stereoisomeren im Wein. Dtsch Leb. Rundsch 273-276.
- 20 Kutyna DR, Varela C, Stanley GA, Borneman AR, Henschke PA, Chambers PJ. 2012. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93:1175-1184.
- 25 Lundquist F. Acetaldehyd: Bestimmung mit Aldehyd-dehydrogenase. Methods of enzymatic analysis. Methods Enzym. Anal.
- Michnick S, Roustan JL, Remize F, Barre P, Dequin S. 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. Yeast Chichester Engl. 13:783-793.
- 30 Remize F, Roustan JL, Sablayrolles JM, Barre P, Dequin D. 1999. Glycerol overproduction by engineered *saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in By-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. Appl. Environ. Microbiol. 65:143-149.

REIVINDICACIONES

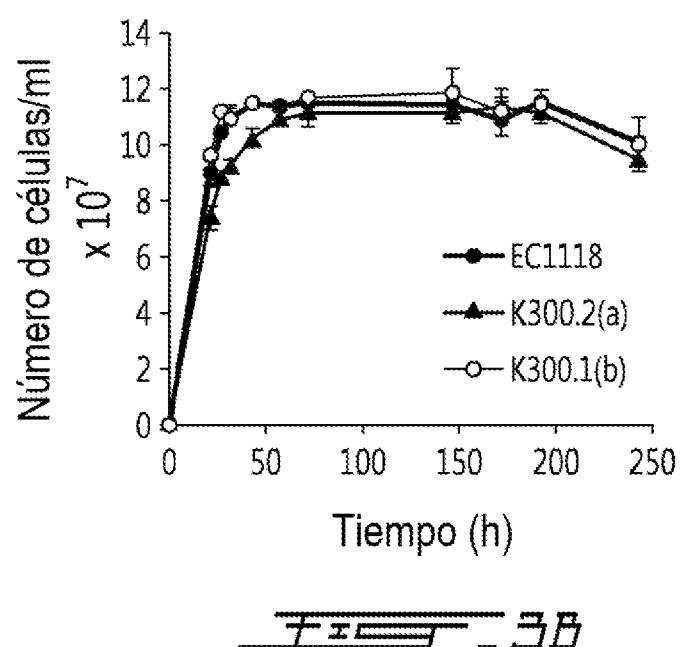
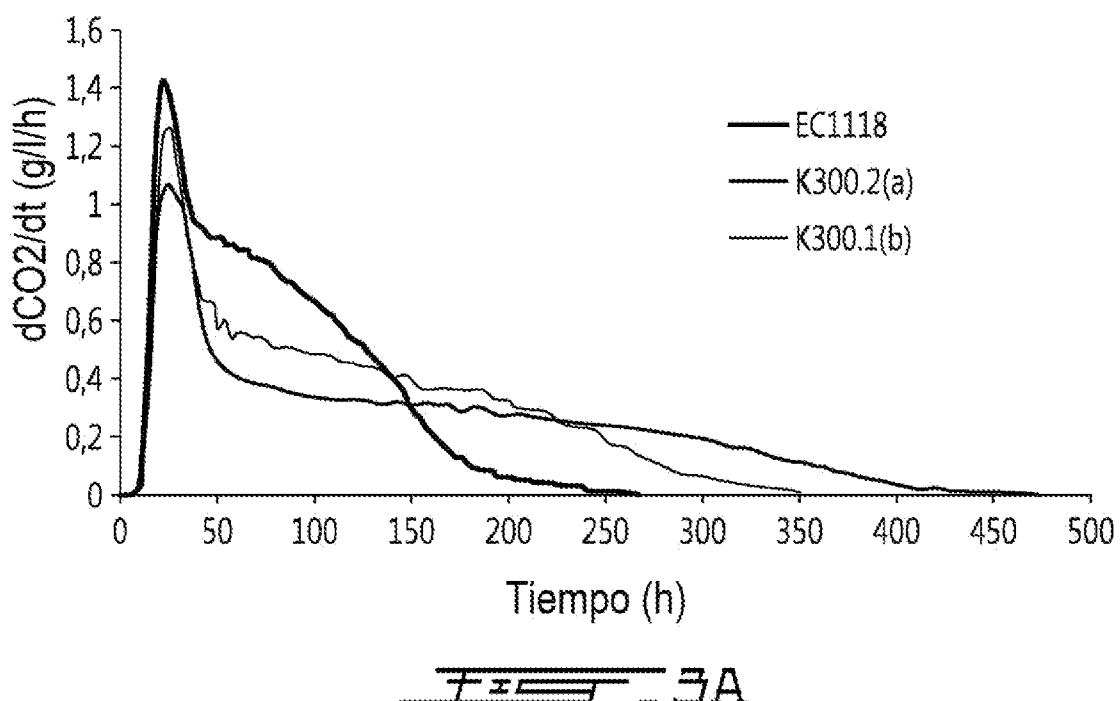
1. Un proceso para producir una cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante capaz de producir, en comparación con la cepa de levadura ancestral, más glicerol, menos etanol y menos acetato durante un proceso de fermentación alcohólica de un mosto de uva natural, comprendiendo dicho proceso:
- 5 a) cultivar la cepa de levadura ancestral en un primer medio de cultivo que comprende una sal capaz de provocar un estrés hiperosmótico a la cepa de levadura ancestral, en donde la cepa de levadura ancestral se cultiva en concentraciones crecientes de sal y en condiciones para lograr el agotamiento de la glucosa en el primer medio de cultivo, a fin de obtener una primera cepa de levadura cultivada, en donde la concentración de la sal en el primer medio de cultivo está entre 1,25 M y menos de 2,4 M; y
- 10 b) cultivar la primera cepa de levadura cultivada en un segundo medio de cultivo que comprende la sal, en donde la primera cepa de levadura cultivada se cultiva a una concentración salina fija y en condiciones que permitan alcanzar el agotamiento de la glucosa en el segundo medio de cultivo de tal manera que se obtenga la cepa de levadura variante, en donde la concentración de la sal en el segundo medio de cultivo es al menos 2,4 M;
- 15 en donde la sal tiene un contracación que es diferente al catión sodio; y
la sal tiene un catión que carece de toxicidad con respecto a la cepa de levadura ancestral cuando se usa a una concentración para proporcionar una osmolalidad inicial de al menos 1 500 mmol/kg.
- 20 2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende, en la etapa a), aumentar la concentración de sal semanal o mensualmente.
- 25 3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde, en la etapa a), la concentración de glucosa en el primer medio de cultivo antes del cultivo está entre el 14,0 % y el 8,0 % (p/v) con respecto al volumen total del primer medio de cultivo.
- 30 4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, en la etapa b), la concentración de glucosa del segundo medio de cultivo antes del cultivo es el 8,0 % (p/v) con respecto al volumen total del segundo medio de cultivo.
- 35 5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además el cruzamiento de esporas haploides de la cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante para obtener una cepa híbrida variante.
- 40 6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal tiene un contracación potasio.
- 45 7. El proceso de la reivindicación 6, en donde la sal es KCl.
- 50 8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces arboricolus*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriadzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces carsbergensis*, *Saccharomyces uvarum* e híbridos interespecie.
- 55 9. Una cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante capaz de producir, en comparación con una cepa de levadura ancestral, más glicerol, menos etanol y menos acetato en un proceso de fermentación alcohólica de un mosto de uva natural, en donde dichas cepa de levadura variante y cepa de levadura ancestral son organismos no modificados genéticamente, obteniéndose dicha levadura variante mediante el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 60 10. La cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante de la reivindicación 9, que es la cepa de levadura variante depositada en el Instituto Pasteur, el 9 de enero de 2014, con el número de registro de la Collection Nationale des Cultures des Microorganismes (CNCM) I-4832.
- 65 11. La cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante de la reivindicación 9, que es la cepa de levadura variante depositada en el Instituto Pasteur, el 18 de octubre de 2012 con el número de registro de la Collection Nationale des Cultures des Microorganismes (CNCM) I-4684.
- 70 12. La cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante de la reivindicación 9, que es la cepa de levadura variante depositada en el Instituto Pasteur, el 28 de enero de 2015 con el número de registro de la Collection Nationale des Cultures des Microorganismes (CNCM) I-4952.
- 75 13. Un proceso para elaborar un producto fermentado, comprendiendo dicho proceso poner en contacto la cepa de levadura *Saccharomyces* sp. variante de una cualquiera de la reivindicaciones 10 a 12 con un mosto de uva natural.
- 80 14. El proceso de la reivindicación 13, en donde el producto fermentado es vino, preferentemente vino tinto.

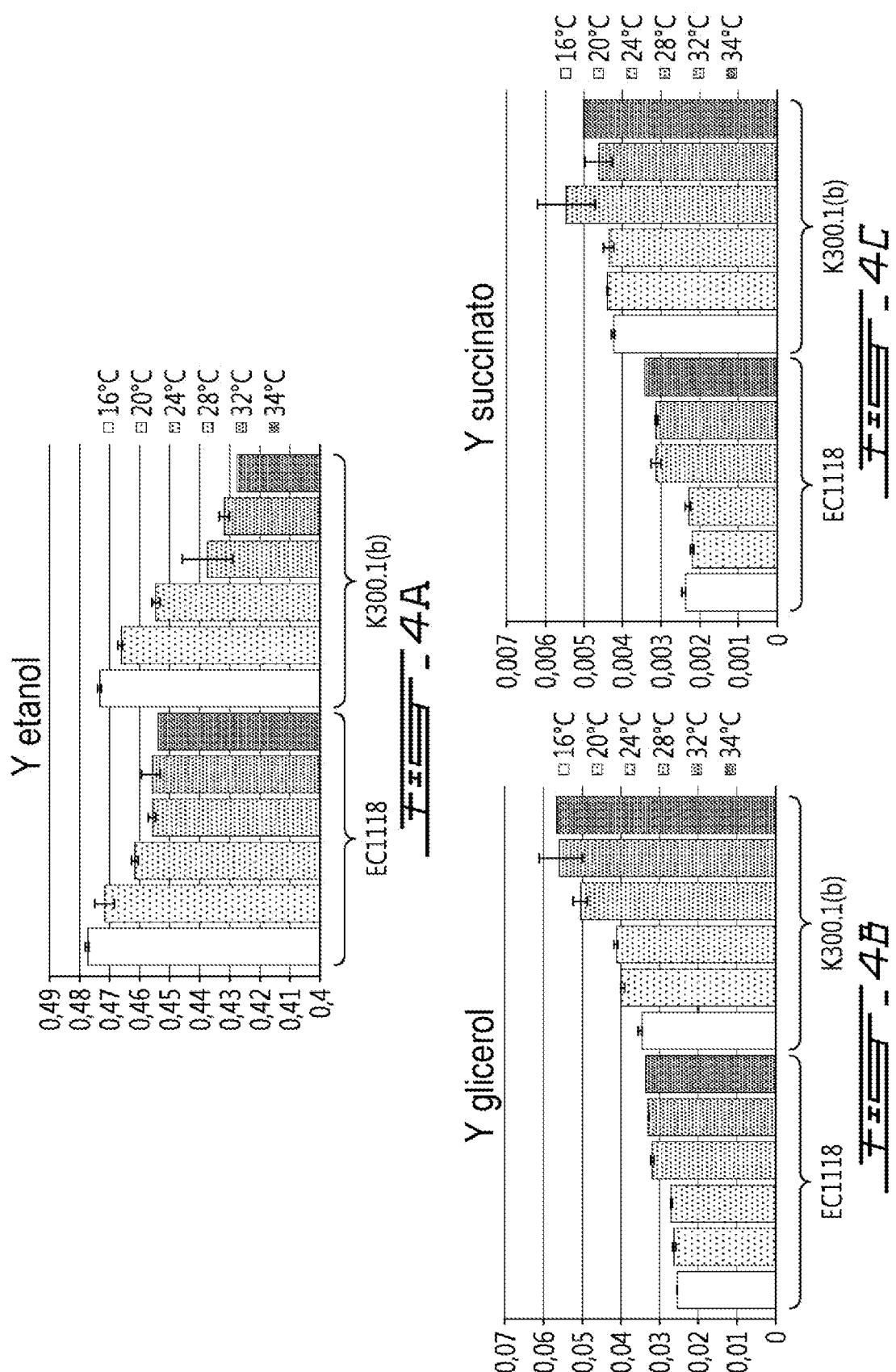


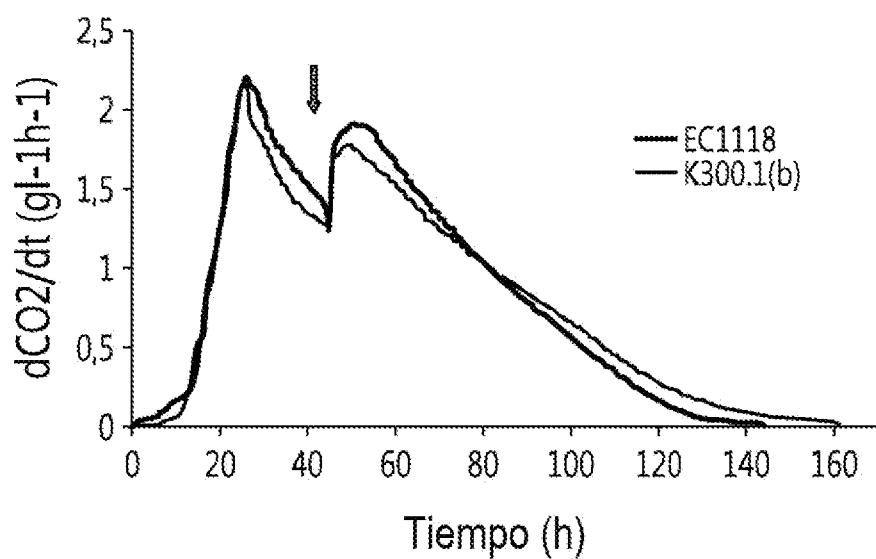




_____ 2



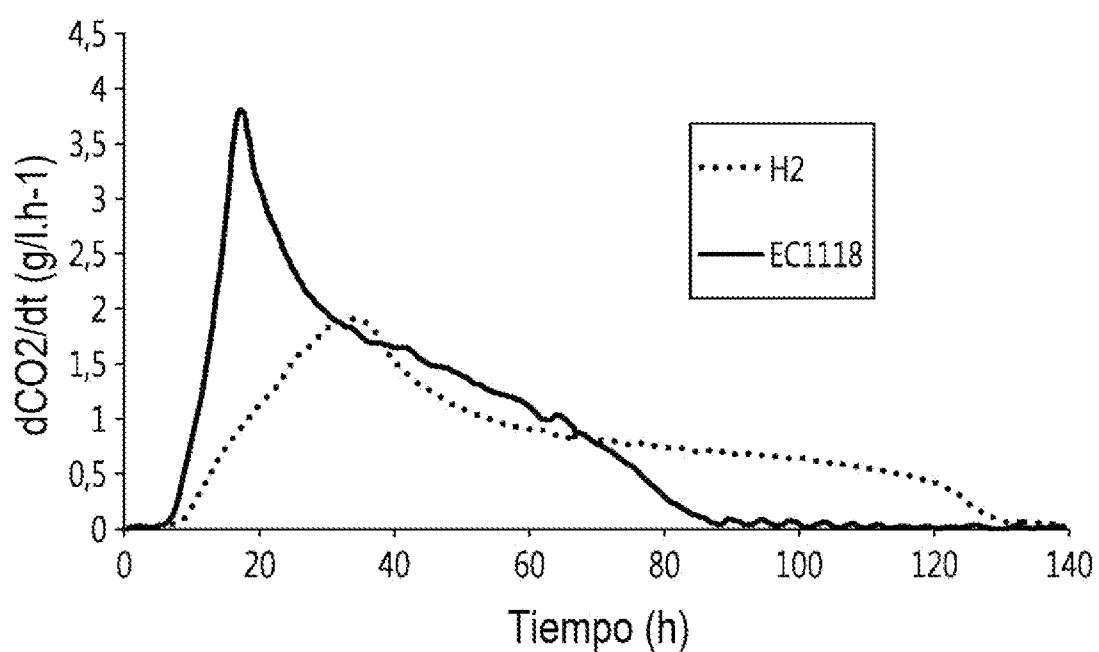




— EC1118
— K300.1(b)

Tiempo (h)

— EC1118
— K300.1(b)

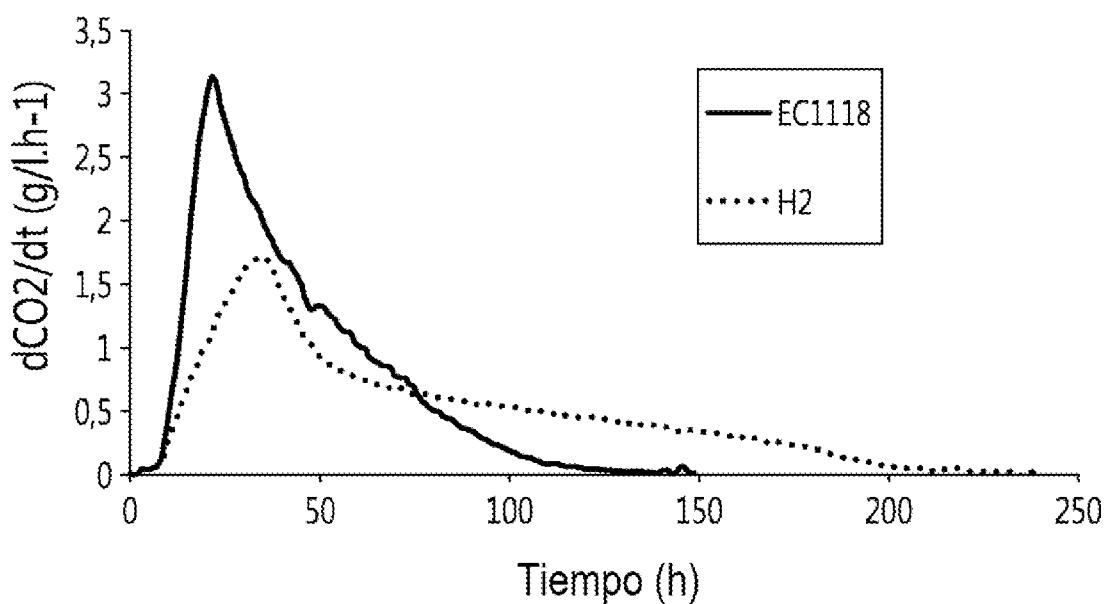


— H₂
— EC1118

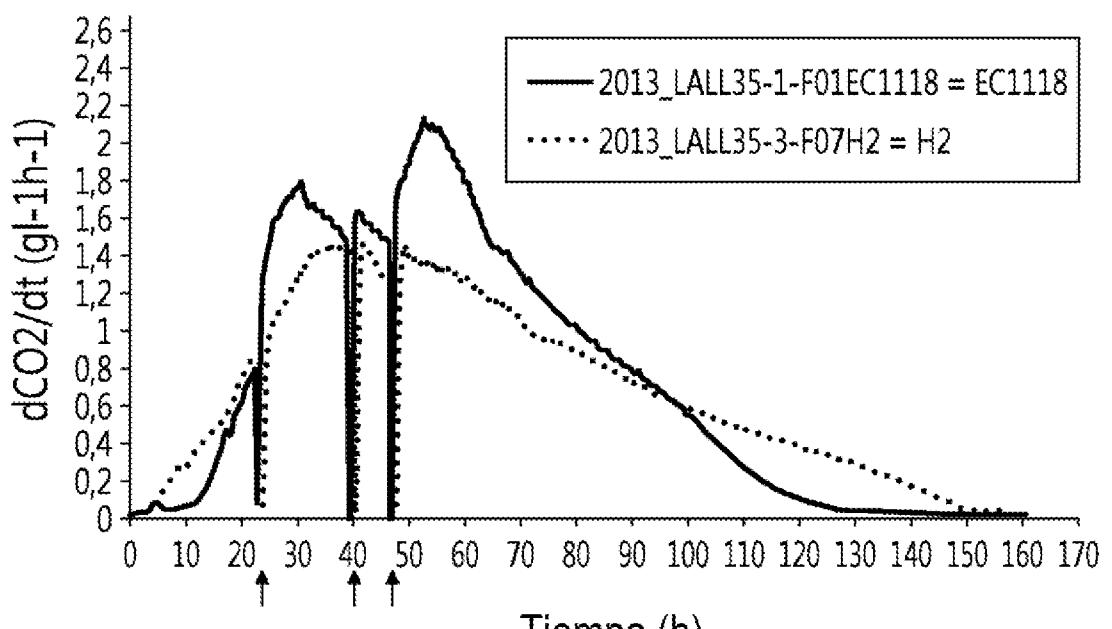
Tiempo (h)

— H₂
— EC1118

Tiempo (h)



—
—
—
—
—
—
—



—
—
—
—
—
—
—