



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 585**

51 Int. Cl.:
C12N 1/19 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01932462 .3**
86 Fecha de presentación : **15.05.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1282686**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54 Título: **Levadura recombinante para materias primas lignocelulósicas.**

30 Prioridad: **15.05.2000 ZA 00/2363**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Forskarpatent I SYD**
Idéon
223 70 Lund, SE

72 Inventor/es: **Hahn-Hägerdal, Bärbel;**
Van Zyl, Willhem Herber y
Cordero Otero, Ricardo, Roman

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 292 585 T3

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

DESCRIPCIÓN

Levadura recombinante para materias primas lignocelulósicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para obtener levadura para la fermentación de sustancias brutas de lignocelulosa y levadura recombinante para la fermentación de las sustancias brutas de lignocelulosa.

10 **Antecedentes de la invención y descripción de la técnica anterior**

La lignocelulosa es el principal componente de los residuos de los productos forestales y de los desechos de la agricultura. Las sustancias brutas lignocelulósicas están compuestas principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La fracción de celulosa está compuesta de polímeros de glucosa, mientras que la fracción de hemicelulosa está compuesta de una mezcla de polímeros de glucosa, galactosa, manosa, xilosa y arabinosa. La fracción de lignina es un polímero de compuestos fenólicos. La xilosa se encuentra en las hemicelulosas de madera dura y madera blanda, mientras que la arabinosa es un componente de la hemicelulosa de algunos cultivos de agricultura, como el maíz.

Las fracciones de celulosa y de hemicelulosa se pueden hidrolizar en azúcares monoméricos, que se pueden fermentar a etanol. El etanol puede servir como un combustible líquido medioambientalmente aceptable para el transporte, ya que el dióxido de carbono liberado en los procesos de fermentación y de combustión será absorbido por las plantas en crecimiento de los bosques y campos.

El precio del etanol obtenido de la lignocelulosa ha sido estimado por Von Sivers, M., G. Zacchi, L. Olsson, y B. Hahn-Hägerdal. 1994 "Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*". *Biotechnol. Prog.* 10: 555-560. Sus cálculos se basaron en la fermentación de todos los azúcares de hexosa (glucosa, galactosa y manosa) a etanol y estimaron que la fermentación de los azúcares de pentosa (xilosa y arabinosa) a etanol podían reducir el precio del etanol entorno al 25%. Por lo tanto, la conversión microbiana de las hexosas y las pentosas obtenidas de las lignocelulosas sería no sólo medioambientalmente aceptable sino también rentable.

Además, la liberación de los azúcares monoméricos a partir de sustancias brutas lignocelulósicas también libera subproductos, tales como ácidos débiles, furanos y compuestos fenólicos, que son inhibidores del procedimiento de fermentación. La levadura panadera utilizada habitualmente, *Saccharomyces cerevisiae*, es el único microorganismo productor de etanol que es capaz de fermentar con eficacia los hidrolizados de lignocelulosa sin desintoxicar (Oisson y Hahn-Hägerdal, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production", *Enzyme Microbial Technol.* 18: 312-331, 1996). Particularmente, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que fermentan con eficacia se han aislado de la planta de fermentación en una fábrica de papel y de pulpa (Lindén *et al.*, "Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant". *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1661-1669, 1992).

Saccharomyces cerevisiae fermenta los azúcares hexósicos glucosa, galactosa y manosa para proporcionar etanol, pero es incapaz de fermentar los azúcares de pentosa xilosa y arabinosa debido a la ausencia de una o más etapas enzimáticas. *Saccharomyces cerevisiae* puede fermentar la xilulosa, un producto de isomerización de la xilosa, a etanol (Wang *et al.*, "Fermentation of a pentose by yeasts", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 248-254, 1980; Chiang *et al.*, "D-Xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 284-289, 1981; Senac y Hahn-Hägerdal, "Intermediary metabolite concentrations in xylulose- and glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells", *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 120-126, 1990).

En las células eucariotas, el metabolismo inicial de la xilosa lo cataliza una xilosa reductasa (XR), que reduce la xilosa a xilitol, y una xilitol deshidrogenasa (XDH), que oxida el xilitol a xilulosa. La xilulosa es fosforilada a 5-fosfato de xilulosa por una xilulosa cinasa (XK) y se metaboliza adicionalmente a etanol a través de la vía de las pentosas fosfato y de la glucólisis.

Saccharomyces cerevisiae se ha modificado genéticamente para metabolizar y fermentar la xilosa. Los genes para XR y XDH de la levadura fermentadora de la xilosa *Pichia stipitis* se han expresado en *Saccharomyces cerevisiae* (patente europea de C. Hollenberg, 1991; Halborn *et al.*, "Recombinant yeasts containing the DNA sequences coding for xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes", W091/15588; Kötter y Ciriacy, "Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 776-783, 1993). Los transformantes metabolizan la xilosa pero no fermentan el azúcar de pentosa a etanol.

El gen de la xilulosa cinasa (XK) de *Saccharomyces cerevisiae* se ha clonado y sobreexpresado en transformantes que expresan XR-XDH de *Saccharomyces cerevisiae* (Deng y Ho, "Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the clone xylulokinase gene", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25: 193-199, 1990; Ho y Tsao, "Recombinant yeasts for effective fermentation of glucose and xylose", W095/13362, 1995; Moniruzzaman *et al.*, "Fermentation of corn fibre sugars by an engineered xylose utilizing a *Saccharomyces* strain", *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 341-346, 1997). Se ha demostrado que estas cepas producen cantidades netas de etanol en fermentaciones de mezclas de xilosa y glucosa. Utilizando el protocolo de integración ribosómica bien establecido, los genes se han integrado en un cromosoma para generar cepas que se pueden utilizar en medio completo sin presión

selectiva (Ho y Chen, "Stable recombinant yeasts for fermenting xylose to ethanol", WO97/42307; Toon *et al.*, "Enhanced cofermentation of glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* yeast strains in batch and continuous operating modes", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63/65: 243-255, 1997).

5 Aunque se han realizado grandes avances, existe una necesidad en la técnica de un método y de una herramienta para fermentar con eficacia los hidrolizados de lignocelulosa para producir etanol.

Compendio de la invención

10 De acuerdo con la invención, un método para obtener una levadura recombinante, que fermenta sustancias brutas de lignocelulosa a etanol, incluye introducir ADN en una levadura para causar que la levadura tenga introducidos los genes que codifican la xilosa reductasa, la xilitol deshidrogenasa y la xilulocinasa.

15 En particular, la invención se refiere a un método para obtener una levadura mutada y recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* que fermenta las sustancias brutas de lignocelulosa a etanol, que incluye introducir ADN en una levadura para causar que la levadura tenga introducidos los genes que codifican la xilosa reductasa obtenida de *Pichia stipitis*, la xilitol deshidrogenasa obtenida de *Pichia stipitis* y la xilulocinasa obtenida de *Saccharomyces cerevisiae* y realizar una mutación de la cepa así obtenida para proporcionar una cepa mutante que crece sobre un nutriente mínimo que contiene xilosa como única fuente de carbono.

20 En una realización preferida, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es *S. cerevisiae* USM21.

En una realización preferida, la cepa *S. cerevisiae* USM21 se ha depositado como CBS 102678.

25 En una realización preferida, el método incluye proporcionar mutantes adecuados mediante tratamiento con etil-metanosulfonato (EMS).

En una realización preferida, el hidrolizado lignocelulósico es un hidrolizado sin desintoxicar.

30 En una realización preferida, el hidrolizado lignocelulósico es un hidrolizado desintoxicado.

En una realización preferida, el hidrolizado lignocelulósico es un hidrolizado derivado de madera blanda.

35 En una realización preferida, el hidrolizado lignocelulósico es un hidrolizado derivado de madera dura.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una levadura recombinante y mutada de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene genes introducidos que codifican la xilosa reductasa obtenida de *Pichia stipitis*, la xilitol deshidrogenasa obtenida de *Pichia stipitis* y la xilulocinasa obtenida de *Saccharomyces cerevisiae* y que es capaz de crecer en un nutriente mínimo que contiene xilosa como única fuente de carbono.

40 En una realización preferida, *S. cerevisiae* se ha depositado con el número de depósito CBS 102678.

En una realización preferida se incluyen los mutantes producidos mediante un tratamiento con etil-metanosulfonato (EMS).

45 En una realización preferida, el mutante muestra una tasa de crecimiento sobre su cepa básica de más del 30%.

En una realización preferida, el mutante está depositado con el número de depósito CBS 102679.

50 En una realización preferida, el mutante está depositado con el número de depósito CBS 102680.

Breve descripción de los dibujos

55 A continuación, se describirá la presente invención mediante ejemplos con referencia a los dibujos acompañantes, en los que se entra a continuación:

La figura 1 es una representación esquemática de la presente invención, que indica el mapa físico del vector de expresión Ylp2B6 que contiene los genes de *Pichia stipitis* *XLY1* y *XLY2* que codifican las XR y XDH, y el gen *XK* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica la XK. PGK_p = promotor de PGK; PGK_t; terminador de PGK.

60 La figura 2 es una representación gráfica de la presente invención, que indica el crecimiento mostrado por dos mutantes independientes fermentadores de xilosa (XLY125 ■, XLY145 X) y la cepa de referencia (XYLUSM21 λ) en SCX.

65 Descripción detallada de los dibujos

De acuerdo con la invención, se da a conocer un método para proporcionar un microorganismo con la capacidad de fermentar con eficacia sustancias brutas de lignocelulosa para producir etanol. El método da a conocer las etapas de

ES 2 292 585 T3

- transformar el microorganismo con una secuencia nucleotídica que comprende genes que codifican ciertas enzimas degradantes de xilosa; y
- un promotor para impulsar la transcripción de estos genes en el microorganismo transformado y la producción de estas enzimas.

Si se requiere efectuar la síntesis y la secreción de estas enzimas por el microorganismo, las secuencias nucleotídicas pueden además incluir secuencias líder para estos genes.

El microorganismo es una cepa de levadura, y el método proporciona la cepa de levadura con la capacidad de producir, al menos, una de las siguientes enzimas que utilizan lignocelulosa:

- xilosa reductasa (XR);
- xilitol deshidrogenasa (XD);
- xilulocinasa (XK).

La invención además incluye un método para fermentar sustancias brutas lignocelulósicas con un microorganismo que ha sido transformado en un microorganismo que utiliza xilosa mediante la introducción en el microorganismo de:

- ADN que comprende genes que codifican enzimas que utilizan la xilosa; y
- un promotor para impulsar la transcripción de estos genes en el microorganismo y la producción de estas enzimas.

El ADN recombinante a utilizar para transformar un microorganismo para proporcionarle una capacidad para fermentar sustancias brutas de lignocelulosa, comprendiendo dicho ADN:

- genes que codifican enzimas que utilizan xilosa; y
- un promotor para impulsar la transcripción de estos genes en el microorganismo transformado y la producción de estas enzimas.

Los genes de la xilosa reductasa (XR), la xilitol deshidrogenasa (XD) y la xilulocinasa (XK) que codifican las enzimas que utilizan xilosa se pueden obtener de los microorganismos siguientes:

- *Pichia stipitis* (para los genes de las XR y XD)
- *Saccharomyces cerevisiae* (para el gen de la XK)

El método para proporcionar un microorganismo también abarca el aislamiento de mutantes sobre la base de su capacidad para crecer rápidamente sobre xilosa y la caracterización de las cepas seleccionadas, comprendiendo dicho método un tratamiento con etil-metanosulfonato (EMS).

Los mutantes son XLY125 y XLY145, y pueden utilizar de manera eficaz xilosa en ausencia de otras fuentes de carbono.

Se apreciará que las levaduras recombinantes, los mutantes, las moléculas de ADN y los vectores que comprenden los genes de la xilosa reductasa (XR), de la xilitol deshidrogenasa (XD) y de la xilulocinasa (XK) que da a conocer la presente invención es notorio que se producen en una serie de microorganismos y que, de hecho, se han identificado y aislado numerosos genes de XR, XD y XK. La fuente particular de estos genes no es decisiva para los aspectos amplios de esta invención, siempre y cuando las enzimas produzcan actividad XR, XD y XK. Además, se pueden obtener estos genes como genes de XR, XD y XK que se producen en la naturaleza o que se pueden modificar o sintetizar mediante cualquier técnica conocida en el estado actual de la técnica.

Además, la presente invención proporciona uno o más promotores y/o secuencias líder para impulsar la transcripción de los genes y la producción de las enzimas.

Un vector de expresión preferido comprende los genes de la xilosa reductasa y la xilitol deshidrogenasa de *Pichia stipitis* y un gen de la xilulocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (junto con promotores adecuados y posibles secuencias líder) que, cuando se transformen en *Saccharomyces cerevisiae*, le permitirán utilizar la xilosa.

Se realizaron depósitos legales bajo las regulaciones del Tratado de Budapest de la cepa transgénica de *Saccharomyces cerevisiae* (XYLUSM21) así como los dos mutantes (XYLUSM125, XYLUSM145) en el Centraalbureau voor Scimmelcultures (CBS) Baarn \$ Delft, Países Bajos. Los depósitos se realizaron el 1 de mayo de 2000 con los números de depósito CBS 102678 (XYLUSM21), CBS 102679 (XYLUSM125) y CBS 102680 (XYLUSM145), respectivamente.

ES 2 292 585 T3

A continuación se ilustrarán las realizaciones preferidas del método de la presente invención por medio de los ejemplos siguientes no limitantes:

Ejemplo 1

5

Construcción de la cepa transgénica de Saccharomyces cerevisiae (XYLUSM21)

Se construyeron los transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* (USM21) que llevaban los genes de la xilosa reductasa (XR) y de la xilitol deshidrogenasa (XDH) de la levadura que utiliza xilosa, *Pichia stipitis*, y el gen de la xilulocinasa (XK) de *Saccharomyces cerevisiae*. Los tres genes se colocaron bajo el control de las secuencias promotora y terminadora de PGK. Las células competentes de USM21 se transformaron con el fragmento *PsI* lineal del YIp2B6, como sustancialmente se mostró en la figura 1 para integrar una sola copia en el locus *HIS3* mediante un solo entrecruzamiento. Las células transformadas se sembraron en placa sobre el medio YPX.

15 Aparecieron transformantes que utilizan xilosa al cabo de 4 días a 28°C. Se comprobó la correcta integración mediante análisis de transferencia Southern y se conservó un transformante (cepa XYLUSM21).

Mutagénesis

20 Se realizó un tratamiento con etil-metanosulfonato (EMS) de acuerdo con Ausubel *et al.* ("Current protocols in molecular biology", volumen 2.º, cap. 13, 1.ª edición. John Wiley & Sons, Inc, 1998, Massachusetts).

Tratamiento con etil-metanosulfonato (EMS) para obtener dos mutantes (XLY125, XLY145)

25 La cepa transgénica de *Saccharomyces cerevisiae* (XYLUSM21) se trató con etil-metanosulfonato (EMS) para obtener una tasa de supervivencia del 20%, 30%, 40% y 50%. Las células tratadas se lavaron una vez con tiosulfato de sodio al 5% y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se resuspendieron las células en agua destilada estéril. Se transfirieron todas las células juntas en el mismo punto del tiempo a 50 ml de medio YPD complementado con ampicilina (todas en un cultivo líquido del medio YPD de 50 ml) y se incubaron durante 24 horas a 22°C. Se transfirió ocho veces el cultivo (XYLUSM21) sobre medio YPX nuevo con ampicilina a intervalos de 24 horas y se monitorizó la fermentación de la xilosa por las células en tubos Durham en medio YPX a intervalos de 24 horas. Las muestras de 2 ml que se tomaban del cultivo cada 24 horas se sembraron en placas de YPX complementado con ampicilina y, luego, se guardaron las colonias que mostraban una velocidad de crecimiento más rápido.

35 A partir de los resultados de la primera etapa de detección, se seleccionaron dos mutantes (XYLUSM125, XYLUSM145) con una velocidad de crecimiento más rápida que la de la cepa de referencia (XYLUSM21) sobre medio YPX complementado con ampicilina y se examinó su crecimiento. Para los cultivos en matraces con agitación, los organismos se cultivaron previamente en matraces con agitación de 50 ml, que contenían 10 ml de medio YPD y se incubaron en un agitador rotatorio a 150 rpm y a 30°C durante 16 horas. Se utilizaron estos cultivos para inocular matraces Erlenmeyer de 500 ml, que contenían 50 ml de medio SCX con ampicilina. Se incubaron cultivos en un agitador rotatorio a 150 rpm y 30°C.

40 Los mutantes XYLUSM125 y XYLUSM145 mostraron una mayor velocidad de crecimiento del 100% y del 75%, respectivamente, que la de la cepa transgénica *Saccharomyces cerevisiae* (XYLUSM21), como se muestra en la figura 2. Estos mutantes pueden utilizar de manera eficaz la xilosa en ausencia de otras fuentes de carbono.

Ejemplo 2

Cepa y medios de cultivo

50

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* del vino USM21 (*Kil⁺ Gal⁺*) (van der Westhuizen and Pretorius, "The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes", Antonie van Leeuwenhoek 61: 249-257, 1992; ZA 91/9818) se empleó como la receptora de los experimentos de transformación. Se cultivaron las cepas de levadura en un medio completo que consistía en extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, glucosa al 2% (YPD) o xilosa al 2% (YPX). Para realizar las curvas de crecimiento, se cultivaron las cepas en medio completo sintético (SCX) que contenía base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos de Difco al 0,67% complementado con xilosa al 2% como única fuente de carbono. Se complementaron todos los medios con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml para prevenir la contaminación bacteriana.

Ejemplo 3

Transformación

60 Se transformó *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con Gietz *et al.* ("Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PÉG procedure", *Yeast* 11: 355-360, 1995).

ES 2 292 585 T3

Ejemplo 4

Técnicas de ADN

- 5 Se preparó ADN plasmídico de *Escherichia coli* utilizando el método del CTAB (Del Sal *et al.*, “A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing”, *Nucleic Acids Res.* 16: 9878, 1988). Se llevaron a cabo técnicas de ADN recombinante estándares esencialmente como se describen en Sambrook *et al.* (“Molecular cloning: a laboratory manual”, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989, NY).

10 Ejemplo 5

Fermentación

- 15 Se realizó la fermentación en un contenedor con hidrolizados de abeto. Por ese motivo, se cultivó XYLUSM125 en xilosa a 20 g/l en medio mínimo (Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers y J. P. Van Dijken. 1992. “Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation”. *Yeast*: 8: 501-507) y se mantuvo XYLUSM125 en un cultivo continuo sobre xilosa a 20 g/l, utilizando una velocidad de dilución de $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ (nota: fermentación aeróbica, añadiendo oxígeno). La velocidad de crecimiento obtenida con xilosa como única fuente de carbono fue $U_{\text{max}} = 0,14 \text{ a } 0,15 \text{ h}^{-1}$ y el rendimiento de biomasa fue de $0,4 \text{ g g}^{-1}$, así aproximadamente una biomasa de 8 g/l sobre xilosa a 20 g/l como fuente de carbono. Cuando se cambió la alimentación a xilosa a 20 g/l más glucosa a 20 g/l, la biomasa aumentó a 18 g/l y el resultado sorprendente fue que sólo quedó xilosa a 4-5 g/l. Esto indica que XYLUSM125 utiliza simultáneamente glucosa a 20 g/l más xilosa a 15 ó 16 g/l en una fermentación continua a $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

- 25 Se repitió el experimento, pero en esta ocasión primero se alimentó con glucosa a 20 g/l para establecer un estado estacionario en fermentación continua, utilizándose toda la glucosa con un rendimiento de biomasa de aproximadamente 6 g/l. Cuando se cambió la alimentación a glucosa a 20 g/l más xilosa a 20 g/l, el rendimiento de biomasa subió a casi 14 g/l con utilización de toda la glucosa y utilización de xilosa a casi 10-12 g/l (es decir, quedó xilosa a 8-10 g/l).

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para obtener una levadura mutada y recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta sustancias brutas de lignocelulosa a etanol, que incluye introducir ADN en una levadura para causar que la levadura tenga introducidos genes que codifican la xilosa reductasa obtenida de *Pichia stipitis*, la xilitol deshidrogenasa obtenida de *Pichia stipitis* y la xilulocinasa obtenida de *Saccharomyces cerevisiae*, y realizar una mutación de la cepa así obtenida para proporcionar una cepa mutante que crece sobre nutriente mínimo que contiene xilosa como única fuente de carbono.

10 2. Un método según la reivindicación 1, en el que la cepa de *S. cerevisiae* está depositada con el número de depósito CBS 102678.

15 3. Un método según la reivindicación 1, que incluye proporcionar mutantes adecuados mediante tratamiento con etil-metanosulfonato (EMS).

4. Un método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el hidrolizado de lignocelulosa es un hidrolizado sin desintoxicar.

20 5. Un método según una o más de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, en el que el hidrolizado lignocelulósico es un hidrolizado desintoxicado.

6. Un método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el hidrolizado lignocelulósico es un hidrolizado obtenido de madera blanda.

25 7. Un método según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el hidrolizado lignocelulósico es un hidrolizado obtenido de madera dura.

30 8. Una levadura mutada y recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene genes introducidos que codifican la xilosa reductasa obtenida de *Pichia stipitis*, la xilitol deshidrogenasa obtenida de *Pichia stipitis* y la xilulocinasa obtenida de *Saccharomyces cerevisiae*, y que es capaz de crecer en un nutriente mínimo que contiene xilosa como única fuente de carbono.

35 9. Una levadura según la reivindicación 8, estando dicha *S. cerevisiae* depositada con el número de depósito CBS 102678.

10. Una levadura según la reivindicación 8, la cual se ha mutado mediante tratamiento con etil-metanosulfonato (EMS).

40 11. Una levadura según la reivindicación 10, en la que el mutante está depositado con el número de depósito CBS 102679.

45 12. Una levadura según la reivindicación 10, en la que el mutante está depositado con el número de depósito CBS 102680.

50

55

60

65

70

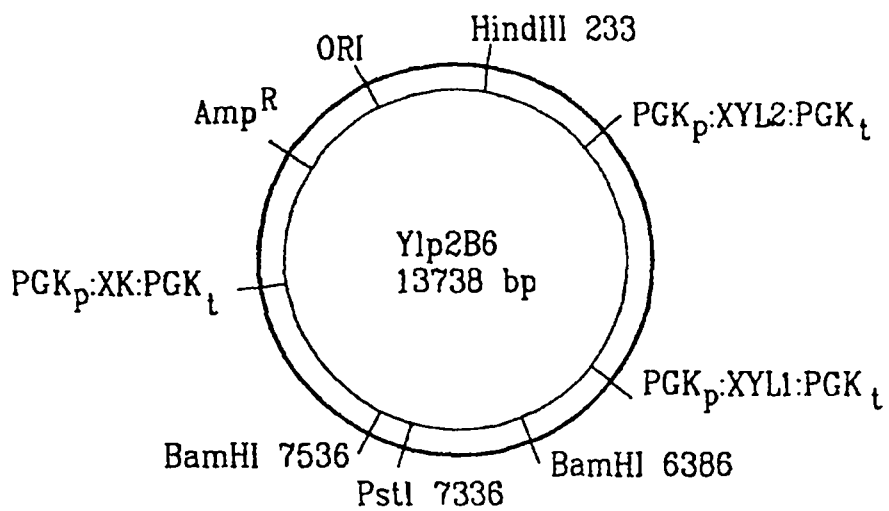


FIG.1

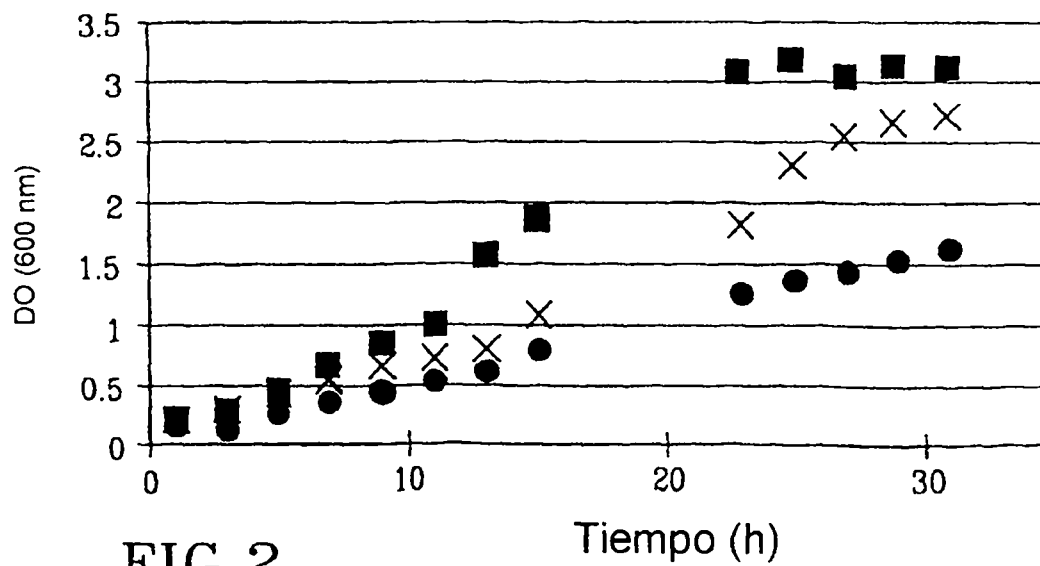


FIG.2