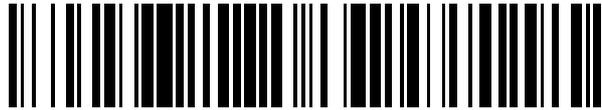


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 633**

21 Número de solicitud: 200930561

51 Int. Cl.:

C12N 15/01 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **04.08.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2011**

Fecha de la concesión: **21.12.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **02.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
02.01.2012

73 Titular/es:
**FUNDACION LEIA CENTRO DE DESARROLLO
TECNOLOGICO
PARQUE TECNOLOGICO DE ALAVA, C/
LEONARDO DA VINCI S/N
01510 MIÑANO, ARABA/ÁLAVA, ES**

72 Inventor/es:
**MUÑOZ PELAEZ, CARMEN;
TORRECILLA SORIA, JESÚS;
OCHOA GOMEZ, JOSE RAMON y
RONCAL MARTINEZ, TOMAS**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **CEPA MUTANTE DE LACTOCOCCUS LACTIS LACTIS Y MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ACETOÍNA.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a la obtención de una bacteria ácido láctica mutante, la cepa L. lactis lactis CML B4, que dispone de una elevada capacidad de producir el compuesto químico acetoína. La bacteria mencionada presenta una actividad enzimática lactato deshidrogenasa reducida, inferior al 10% de la actividad de la cepa madre. Como consecuencia de ello, dicha cepa mutante produce una cantidad de acetoína más de diez veces superior a la producida por la cepa madre, de tipo silvestre, cuando ambas son cultivadas en idénticas condiciones en un medio de cultivo que contiene 10 g/L de glucosa como fuente de carbono. La presente invención se refiere también al desarrollo de un procedimiento eficiente de producción de acetoína mediante fermentación en condiciones aeróbicas basado en la utilización de la cepa de la invención. En las condiciones óptimas de fermentación que originan la máxima producción de acetoína la cepa L. lactis subsp. lactis CML B4 produce hasta 43,06 g de acetoína a partir de 100 g de glucosa en fermentaciones tipo discontinuo (batch), y 72,42 g de acetoína a partir de 200 g de glucosa en fermentaciones tipo semicontinuo (fed-batch).

ES 2 352 633 B1

DESCRIPCIÓN

Cepa mutante de *Lactococcus lactis lactis* y método para la producción industrial de acetoína.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se encuadra dentro del campo de los microorganismos obtenidos por mutación de cepas salvajes. En concreto, la presente invención se refiere a una nueva cepa de *Lactococcus lactis lactis*, derivada de la cepa silvestre NCIMB702118 y caracterizada por su elevada tasa de producción de acetoína así como a un procedimiento de producción de acetoína mediante fermentación por dicho microorganismo.

Estado de la técnica

La acetoína (3-hidroxi-2-butanona o acetilmetilcarbinol) es un compuesto orgánico aromatizante que, junto con el diacetilo (2,3-butanodiona o dimetilglioxal), es el que confiere el típico aroma a mantequilla presente en diversos derivados lácteos, tales como la mantequilla, la nata y algunos quesos.

La acetoína presenta un elevado interés por su utilización como aroma, con potenciales aplicaciones como aditivo en diversos sectores industriales, como el alimentario, el farmacéutico y el cosmético. Aparte de esta utilidad como aditivo aromatizante, por la estructura química de la molécula, que es de pequeño tamaño y cuenta con varios grupos funcionales potencialmente reactivos, puede ser también de interés para la industria química como materia prima de partida para la síntesis de otras moléculas más complejas (*building blocks*) (Werpy, T. y Petersen, G., eds. (2004) Top Valued Added Chemicals From Biomass. Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy).

La producción de acetoína puede llevarse a cabo mediante procedimientos de tipo químico o biotecnológico. Entre los métodos químicos de producción se encuentran la reducción parcial de diacetilo en presencia de cinc y ácidos, la oxidación electroquímica de la metil etil cetona (butanona), y la oxidación selectiva del 2,3-butanodiol. Entre estos métodos, el de mayor aplicación industrial es el que se realiza mediante la oxidación electroquímica de la metil etil cetona, compuesto derivado exclusivamente de materias primas petroquímicas. Si bien estos procedimientos de tipo químico pueden dar lugar a elevados rendimientos de acetoína, las severas condiciones de reacción necesarias y, sobretodo, la utilización de materias primas no renovables derivadas del petróleo, aconsejan el establecimiento de nuevos métodos de producción más sostenibles, a partir de materias primas renovables. Otro problema que presentan, además, los procedimientos químicos es que conducen a la generación de mezclas racémicas de los dos isómeros ópticos de la acetoína.

Por otra parte, la acetoína puede producirse como resultado de la actividad metabólica de ciertos microorganismos. El ejemplo más conocido es su producción durante la fermentación llevada a cabo por ciertas cepas de las denominadas bacterias ácido lácticas, que se encuentran formando parte de los cultivos iniciadores (*starters*) utilizados en la fabricación de diversos derivados lácteos. Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos Gram-positivos, anaerobios facultativos, capaces de convertir los carbohidratos en ácido láctico por medio de un metabolismo homo- o heterofermentativo. Entre las cepas que han sido descritas como productoras de este compuesto, las principales pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*.

La ruta metabólica que conduce a la formación de acetoína ha sido extensamente estudiada en *Lactococcus lactis* y se conoce con gran detalle (Boumerdassi, H. y Cols. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63: 2293-2299; Hugenholtz, J. y Cols. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 4112-4114). La enzima α -acetolactato sintasa cataliza la formación de α -acetolactato a partir de dos moléculas de piruvato (con la pérdida concomitante de una molécula de CO₂). El α -acetolactato, que es una molécula inestable, puede seguir dos rutas alternativas: i) puede sufrir una descarboxilación oxidativa de tipo químico (en presencia de oxígeno) para dar diacetilo, o ii) puede originar acetoína por descarboxilación enzimática catalizada por la α -acetolactato descarboxilasa (la vía mayoritaria). El diacetilo formado puede, a su vez, ser transformado en acetoína mediante la acción de la diacetilo deshidrogenasa o reductasa, con la consiguiente oxidación del cofactor NADH a NAD⁺. Finalmente, la acetoína puede dar lugar a 2,3-butanodiol, en una reacción catalizada por la acetoína deshidrogenasa o reductasa (que realmente es la misma enzima que la diacetilo reductasa), con la oxidación de una segunda molécula de NADH a NAD⁺ (Figura 1).

La ruta principal del metabolismo del piruvato es la formación de lactato, por medio de una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (Neijssel, O.M. y Cols. (1997) J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 83: 12S-19S). Esta enzima cataliza la reducción de piruvato a lactato utilizando NADH como cofactor, que se oxida a NAD⁺. El NADH requerido para esta reacción es generado durante la glucólisis, y debe ser reoxidado a NAD⁺ para que esta ruta metabólica pueda seguir funcionando. Por tanto, en condiciones de anaerobiosis, con elevados flujos glucolíticos, el lactato es prácticamente el único producto final que se obtiene como resultado del metabolismo de los azúcares, resultando en lo que se denomina fermentación homoláctica (Platteeuw, C. y Cols. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61: 3967-3971). En otras condiciones, tales como las que ocurren cuando la velocidad del metabolismo glucídico se reduce o en condiciones aeróbicas, se observa un desplazamiento del metabolismo hacia una fermentación ácido-mixta o heteroláctica (Neijssel, O.M. y Cols. (1997) J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 83: 12S-19S), resultando en la formación de otros metabolitos (acetato, formato, etanol, acetoína, diacetilo) además del lactato.

En el campo de la técnica, se ha intentado conseguir cepas bacterianas con una producción incrementada de acetoina, mediante la inactivación de la actividad lactato deshidrogenasa puesto que, ya que la inmensa mayoría del piruvato celular es transformado en lactato por medio de la enzima lactato deshidrogenasa, la inactivación de esta enzima debería conducir a una mayor disponibilidad del piruvato para las demás rutas metabólicas. Experimentalmente se ha demostrado que la producción de acetoina aumenta en cepas deficientes en actividad lactato deshidrogenasa obtenidas tanto por mutagénesis al azar (Boumerdassi, H. y Cols. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63: 2293-2299; Monnet, C. y Cols. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 5518-5520) como por inactivación dirigida (Platteeuw, C. y Cols. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61: 3967-3971) del gen que codifica esa enzima. Las cepas resultantes mostraban un significativo incremento (superior a un orden de magnitud) en la síntesis de acetoina.

La patente europea EP0928333 describe un método para la obtención de cepas de *Lactococcus lactis* dobles mutantes en la lactato deshidrogenasa y en la piruvato formato liasa, que producen mayores cantidades de α -acetolactato y su metabolito acetoina.

El estado de la técnica comprende también estrategias de sobreexpresión de la actividad α -acetolactato sintasa: esta enzima es la primera específica de la ruta de biosíntesis de acetoina. En principio, podría esperarse que su sobreexpresión causara un mayor flujo del piruvato a través de esta ruta. Sin embargo, el elevado valor de su K_m hacia el piruvato (50 mM) supone una gran limitación en lo referente a la utilidad real de esta estrategia, y los resultados experimentales así lo han corroborado. De hecho, la sobreexpresión de dicha enzima en un factor de hasta 20 veces ha ocasionado incrementos en la síntesis de acetoina prácticamente imperceptibles (Platteeuw, C. y Cols. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61: 3967-3971).

La patente europea EP0663955 trata sobre el aislamiento de un ácido nucleico que codifica la enzima α -acetolactato descarboxilasa y la utilización de éste, empleando técnicas de ingeniería genética, en la obtención de cepas de *Lactococcus lactis* con mayores producciones de acetoina o diacetilo. La patente francesa FR2777905 trata sobre la obtención de bacterias sobreproductoras de α -acetolactato y/o diacetilo, empleando procedimientos de obtención de mutantes en las enzimas lactato deshidrogenasa y α -acetolactato descarboxilasa.

Alternativamente, se utiliza en el estado de la técnica, la sobreexpresión de la actividad NADH oxidasa: Un factor primordial en la regulación de los flujos a través de las diferentes rutas del metabolismo del piruvato es el estado redox celular, en concreto, la relación NADH/NAD⁺. Valores elevados de esta relación favorecen la formación de lactato. Valores reducidos incrementan la participación de otras rutas alternativas, entre ellas la de formación de acetoina. La NADH oxidasa, que interviene en el control de esta relación, catalizando la oxidación de NADH a partir del oxígeno molecular se ve fuertemente incrementada en condiciones de aerobiosis, que son las condiciones en las que se observa la mayor producción de acetoina. Sin embargo, la capacidad máxima celular de actividad NADH oxidasa es limitada y en las condiciones óptimas de funcionamiento los niveles de esos compuestos continúan siendo muy exigüos. Intentos de incrementar dicha actividad enzimática en *L. lactis* por sobreexpresión, bien del propio gen de este microorganismo (Hoefnagel, M.H.N. y Cols. (2002) Microbiology 148: 1003-1013), bien de un gen heterólogo (Hugenholtz, J. y Cols. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 4112-4114; López de Felipe, F. y Cols. (1998) J. Bacteriol. 180: 3804-3808), han resultado en incrementos en la producción de acetoina, alcanzándose niveles similares a los obtenidos en cepas deficientes en la actividad lactato deshidrogenasa.

Los procedimientos descritos arriba, resultan, en general, en la obtención de niveles modestos de acetoina, nunca superiores a 30-35 mM, e insuficientes por tanto para su aplicación en la producción industrial de este compuesto químico. Sin embargo, en la patente europea EP0430406 se describe un procedimiento para la producción de acetoina y diacetilo por bacterias ácido lácticas mediante fermentación que resulta en concentraciones finales de acetoina, de hasta 8,4 g/L (95 mM), si bien ello sólo se consigue mediante la adición al medio de cultivo de sustancias muy caras como porfirina de hierro o tejidos animales que la contienen, hemoproteína (hemina o catalasa) o sangre, o sales de ciertos metales como el cobre que generan el problema de gestionar los residuos contaminantes resultantes. En ausencia de tales aditivos la producción de acetoina por las bacterias utilizadas es inferior a 0,2 g/L (2,3 mM).

El estado de la técnica enseña además procedimientos para la obtención de acetoina que comprenden la utilización de microorganismos diferentes de *L. lactis*. Por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP1820848 se describe una cepa de la bacteria *Bacillus pumilus* que produce grandes cantidades de acetoina, hasta 63 g/L en medios de cultivo que contienen 200 g/L de glucosa o hasta 58,1 g/L en medios con 180 g/L de sacarosa. La solicitud de patente de Estados Unidos US20080182306 describe una cepa mutante de la bacteria *Bacillus subtilis* y un método para la obtención de acetoina mediante fermentación, con el que se consiguen alcanzar concentraciones de este compuesto de hasta 55 g/L en el caldo de fermentación, partiendo de medios de cultivo conteniendo alrededor de 120 g/L de glucosa. En el estado de la técnica también se encuentra referencia a un estudio sobre la optimización de la producción de acetoina por una cepa de *Bacillus subtilis* (Xiao, Z.J. y Cols. (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol., 74: 61-68), utilizando un medio de cultivo conteniendo subproductos agroindustriales, melazas e hidrolizado de soja concretamente. Con este medio se describen producciones máximas de acetoina cercanas a 38 g/L. Estos métodos requieren una prolongada fermentación microbiana, de entre 50 y 60 horas, un tiempo excesivamente prolongado que conlleva tanto una reducción en las productividades como que los procesos puedan difícilmente ser considerados como muy eficientes.

El campo de la técnica carece, por tanto, de un procedimiento eficiente de producción biotecnológica sostenible de acetoina, que permitiera la obtención de elevadas concentraciones de acetoina estereoespecífica con elevados rendimientos y productividades, que permita la producción de acetoina a nivel industrial, partiendo de materias primas

renovables y aprovechando las características que hacen a este tipo de procesos cumplir ampliamente con los criterios de sostenibilidad actualmente vigentes.

5 Para solucionar esta carencia, la presente invención propone una cepa bacteriana con una elevada capacidad de producción de acetoina y un procedimiento eficiente de fermentación utilizando dicha cepa, con rendimientos y productividades también elevados, y susceptible de ser empleado industrialmente.

Explicación detallada de los dibujos

10 Figura 1. Rutas del metabolismo del piruvato en la bacteria *Lactococcus lactis*.

Descripción de tallada de la invención

15 La demanda industrial de acetoina como aditivo alimentario y cosmético, hace deseable un método altamente eficiente de producción. Los métodos microbiológicos destacan de otros métodos de producción por su elevada eficiencia, por ello los inventores han generado mediante mutagénesis una nueva cepa bacteriana altamente eficiente para la producción de acetoina.

20 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es una cepa bacteriana de *Lactococcus lactis lactis*, derivada de la cepa silvestre NCIMB702118, caracterizada porque su actividad lactato deshidrogenasa se encuentra en un rango de entre 0,50-0,75 U/mg y que ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número CECT 7512.

25 Este microorganismo perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas, cuya capacidad de producir acetoina es sorprendentemente elevada, presenta una reducida actividad enzimática lactato deshidrogenasa como consecuencia de un proceso de mutagénesis aleatoria. Taxonómicamente, la cepa de la presente invención (de aquí en adelante también referida como “cepa CML B4”) se clasifica dentro del género *Lactococcus*, especie *lactis*, subespecie *lactis*. Por lo tanto, la cepa de la presente invención, es concretamente la *L. lactis lactis* CML B4.

30 La cepa CML B4 deriva de la cepa de tipo silvestre *L. lactis lactis* NCIMB 702118, depositada en la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria del Reino Unido (anteriormente conocida como NCDO2118 y de aquí en adelante “cepa NCIMB 702118” o “cepa madre”). La mutación aleatoria que la distingue afecta a la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (Tabla 1). Esta mutación se induce mediante un procedimiento de mutagénesis al azar utilizando mutágenos de tipo químico, como el metanosulfonato de etilo (EMS) u otros, aunque la forma de obtención no queda limitada a este procedimiento y cualquier otro de los disponibles en el estado de la técnica puede ser igualmente válido, incluyendo procedimientos de tipo físico, químico, mediante técnicas recombinantes de ingeniería genética u otras.

40 La selección de las cepas que contienen un defecto en la actividad lactato deshidrogenasa se realiza en un medio de cultivo sólido, de baja capacidad tamponante, conteniendo sales de tetrazolio y de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente francesa FR2777905. En este medio las colonias derivadas de cepas con un defecto en la actividad lactato deshidrogenasa adquieren una coloración rojo/parda, por contraposición a la coloración blanca/rosada de las colonias derivadas de cepas con la actividad lactato deshidrogenasa intacta.

45 La cepa de la presente invención, presenta una actividad de la enzima lactato deshidrogenasa que se encuentra en un rango de entre 0,50-0,75 U/mg, es decir, inferior al 20% y, preferiblemente, inferior al 10%, de la actividad de dicha enzima en la cepa madre (tabla 1).

50 En una realización particular de la presente invención, la cepa CML B4, presenta además una actividad enzimática NADH oxidasa que se encuentra en un rango de entre 0,60-0,70 U/mg, es decir, incrementada más de tres veces, y preferiblemente al menos cinco veces, con respecto a la de la cepa madre (Tabla 1).

55 La diferencias con la cepa madre descritas arriba resultan en la producción de una cantidad de acetoina más de diez veces superior a la producida por la cepa madre en las mismas condiciones (Tabla 2). Por lo tanto, en una realización particular, la cepa de la presente invención presenta una producción de acetoina que se encuentra en un rango de entre 45-461 mM en el medio de cultivo, para un procedimiento de fermentación en discontinuo que contiene concentraciones iniciales de glucosa comprendidas entre 10 y 100 g/L, respectivamente. A modo de ejemplo, en un medio de cultivo estándar de los utilizados para cultivar bacterias del género *Lactococcus*, tal como el medio denominado M17, que contiene un 1% (peso/volumen) de un carbohidrato como la glucosa, mientras la cepa madre produce una cantidad de acetoina que alcanza en el medio de cultivo una concentración final de entre 2 y 4 mM, la cepa superproductora produce hasta 45 mM de acetoina (Tabla 2).

65 En otra realización particular, la cepa de la presente invención presenta una producción de acetoina de 70 g/l en el medio de cultivo, en un procedimiento de fermentación semicontinuo que contiene 200 g de glucosa.

La presente invención provee al experto con un procedimiento eficiente de producción de acetoina mediante fermentación microbiana. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es un procedimiento de producción de acetoina, que comprende la fermentación de carbohidratos por la cepa CML B4 en condiciones de aerobiosis.

Dicho procedimiento se inicia con la inoculación del medio a fermentar con la cepa CML B4 y comprende los pasos de

- (a) Precultivo de la cepa CML B4.
- (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el precultivo obtenido en (a)
- (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en (b) a 25-35°C; pH 5,5-7,0 y concentración de oxígeno disuelto de 30-100%
- (d) Separación del medio fermentado en (c) de las células.
- (e) Opcionalmente, purificación de la acetoína vertida al medio durante la fermentación (c)

Cualquier medio nutritivo conteniendo fuentes asimilables de carbono y de nitrógeno, que permita el crecimiento de la cepa CML B4 y la producción elevada de acetoína por ésta puede ser utilizado. Entre las fuentes de carbono asimilables se pueden utilizar, por ejemplo, sin que sea limitante, la glucosa, la fructosa, la sacarosa, la lactosa, la galactosa y las melazas, bien puras o en combinación. Entre las fuentes de nitrógeno asimilables se incluyen por ejemplo, pero sin estar restringidas a ellas, el extracto de carne, el extracto de levadura, los hidrolizados de proteínas o peptonas de carne, de soja, de caseína y de proteínas de lactosuero, y el líquido de maceración del maíz, que pueden ser utilizadas en solitario o en combinación.

Si fuera necesario, porque no son proporcionadas por alguno de los anteriores nutrientes, el medio nutritivo puede suplementarse con otros nutrientes y factores de crecimiento, tales como vitaminas y sales minerales, para asistir en el crecimiento del microorganismo y promover la producción de acetoína. Las vitaminas que pueden emplearse incluyen entre otras la piridoxamina, la biotina, el ácido nicotínico, el pantotenato cálcico, la riboflavina y el ácido lipoico, que pueden añadirse bien mediante mezclas artificiales de composición conocida o bien a través del empleo de preparaciones y extractos nutritivos complejos de origen natural conteniendo tales vitaminas, como por ejemplo el extracto de levadura u otros. Las sales minerales pueden seleccionarse preferentemente del grupo formado por el fosfato y las sales de potasio y magnesio.

El medio nutritivo puede también suplementarse adicionalmente, si fuera necesario por la excesiva formación de espumas durante el cultivo, con un agente antiespumante o un tensioactivo, como por ejemplo los basados en silicona, aceites vegetales, polietilenglicol y otros, de acuerdo a los métodos conocidos.

El cultivo de la cepa CML B4 en el medio nutritivo se puede llevar a cabo por medio de cualquier tecnología estándar de cultivo aeróbico. Los métodos de cultivo en medios nutritivos líquidos son los preferidos, particularmente los cultivos en frascos agitados o en reactores del tipo de fermentadores o quimiostatos.

El cultivo se puede realizar generalmente en un intervalo de temperaturas comprendido entre 15°C y 40°C, preferiblemente entre 25°C y 35°C, y el pH del medio se encuentra generalmente entre 5 y 7,5, preferiblemente en el intervalo 6-7. El control del pH del medio, cuando sea necesario su mantenimiento constante a un valor fijo, se puede realizar mediante la adición al medio de cultivo de un agente tamponante elegido entre cualquiera de los habitualmente utilizados para tal fin, o mediante la adición de una base o un ácido, según sea requerido uno u otro, para contrarrestar las acidificaciones o alcalinizaciones, respectivamente, que el cultivo microbiano pudiera ocasionar.

Las características aerobias del cultivo se pueden garantizar mediante el aporte al medio de cultivo de oxígeno, bien en forma de aire, oxígeno puro o mezclas de diferente composición de ambos. En el caso de cultivos en frascos agitados, el suministro de oxígeno se realiza mediante la agitación de los recipientes de cultivo a una frecuencia comprendida entre 100 y 500 rpm, preferiblemente en el intervalo 200-300 rpm. En el caso de la utilización de reactores de cultivo, el suministro de oxígeno se puede realizar mediante el flujo a través del medio de cultivo de una corriente de aire, oxígeno puro o mezclas de diferente composición de ambos, tal que la concentración de oxígeno disuelto esté comprendida en el intervalo 10-100%, preferiblemente entre el 30 y el 90%, de la concentración de saturación. La agitación del medio de cultivo en el reactor se puede realizar con ayuda de un agitador de palas, operando a una velocidad de giro entre 250 y 1000 rpm, preferiblemente en el intervalo 500-750 rpm.

La acetoína se acumula en el medio de cultivo durante un periodo de 15-40 horas, preferiblemente entre las 20 y 30 horas, desde el inicio del cultivo, que coincide con el momento de la inoculación. Cuando se alcanza la máxima producción de acetoína, que ocurre cuando el microorganismo ha consumido la totalidad del carbohidrato disponible como fuente de carbono, la fermentación se puede considerar concluida.

Una vez concluida la fermentación, las células de la cepa CML B4 deben ser en primer lugar separadas del medio de cultivo líquido. Tal separación se puede realizar preferentemente mediante procedimientos físicos, tales como sedimentación por centrifugación, filtración o cualquier otro de los disponibles en el estado de la técnica.

La acetoína producida, que se encuentra disuelta en el medio de fermentación, puede ser a continuación purificada o utilizada directamente tal como se presenta en disolución acuosa, en este último caso bien sin posterior modificación o

bien tras realizar un proceso de concentración. La purificación, en caso de realizarse, puede llevarse a cabo empleando alguna de las técnicas que el estado de la técnica ofrece, bien en solitario bien combinando varias de ellas, entre las que se encuentran, entre otras: destilación, precipitación, cristalización, pervaporación, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, extracción con fluidos supercríticos, métodos cromatográficos y otros.

5

La acetoina producida mediante el procedimiento que se describe en esta invención puede ser utilizada directamente, como tal, como aditivo aromatizante por ejemplo en las industrias alimentaria, cosmética o farmacéutica. Alternativamente, la acetoina puede ser utilizada también en la industria química como molécula precursora en la

10

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Microorganismos: Los microorganismos que se utilizaron fueron bacterias ácido lácticas de las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* NCIMB 702118, cepa de tipo silvestre, y *L. lactis* subsp. *lactis* CML B4, cepa mutante derivada de la anterior y poseedora de una deficiencia en la actividad enzimática lactato deshidrogenasa.

20

Medio de cultivo: Los cultivos de las cepas empleadas se realizaron en medio M17 (Terzaghi, B.E. y Sandine, W.E. (1975) Appl. Microbiol. 29; 807-813) o medio M17 doblemente concentrado, suplementados con diferentes concentraciones de glucosa, entre 10 y 100 g/L, como fuente de carbono y energía. La composición del medio M17 es la siguiente (en g/L): triptona, 2,5; peptona de carne, 2,5; peptona de soja, 5,0; extracto de carne, 5,0; extracto de levadura, 2,5; glicerofosfato sódico, 19,0; sulfato de magnesio, 0,25; y ácido ascórbico, 0,50.

25

Los experimentos de producción de acetoina se realizaron empleando dos tipos de cultivos.

A. Cultivos en frascos agitados: Los cultivos en frascos agitados se realizaron en matraces erlenmeyer de 100 mL conteniendo 20 mL de medio M17 suplementado con 10 g/L de glucosa. Las condiciones de incubación fueron una temperatura de 30°C y una velocidad de agitación de 250 rpm. Los cultivos se iniciaron con la inoculación del medio con una colonia crecida durante tres días en placa conteniendo el mismo medio y solidificado con agar al 1,5% (p/v).

30

B. Cultivos en fermentador: Los cultivos en fermentador se realizaron en un fermentador de laboratorio Biostat B-plus de la marca Sartorius, equipado con un reactor de 2 L y una unidad de control de los diferentes parámetros de fermentación. El reactor contenía 1 L de medio M17 doblemente concentrado. En los cultivos en modo discontinuo la concentración inicial de glucosa fue de 100 g/L. En los cultivos en modo semicontinuo la concentración inicial de glucosa fue de 100 g/L y, una vez consumida ésta, se les adicionó otros 100 g de glucosa por cada litro inicial de medio. Las condiciones de fermentación fueron una temperatura de 30°C y una velocidad de agitación de 500 o 750 rpm. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo fija en un valor del 30% con respecto a la concentración de saturación del medio, mediante el suministro de un caudal de aire de 2 L/min, en solitario o enriquecido con oxígeno puro, y cuya composición se estableció automáticamente en cada momento según las necesidades. El pH del medio durante la fermentación se fijó en diferentes valores de experimento en experimento, y se mantuvo constante mediante la adición automática de NaOH 5 M.

35

40

45

Durante la realización de los trabajos se han utilizado las siguientes técnicas analíticas:

Medida de la concentración de acetoina: Su determinación se realizó mediante el método de Westerfeld (Westerfeld, W.W. (1945) J. Biol. Chem. 161: 495-502), modificado por Speckman y Collins (Speckman, R.A. y Collins, E.B. (1982) Appl. Environ. Microbiol. 44: 40-43). A 5 mL de muestra, o de una dilución apropiada de la misma, se añadió 1 mL de una solución de α -naftol al 5% (p/v) en NaOH 2,5 M y se incubó durante 15 min. A continuación se añadió 1 mL de creatina al 1% (p/v) y se incubó durante otros 10 min para dejar desarrollar el color. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia del sobrenadante a 535 nm y se comparó con una curva de calibrado realizada con diferentes concentraciones de acetoina pura como patrón. El ensayo mide conjuntamente las concentraciones de acetoina y diacetilo, pero la presencia de este último es prácticamente residual en las muestras analizadas.

50

55

Obtención de extractos celulares: El medio de cultivos realizados durante 24 h se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C para separar las células bacterianas del medio líquido. Después de lavar las células en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7,0), las bacterias se resuspendieron en el mismo tampón concentradas 20 veces. A esta suspensión celular se añadió un volumen igual de bolitas de vidrio (*glass beads*) y todo el conjunto se sometió a tres rondas de agitación de 30 segundos con agitador de tubos operando a la velocidad máxima, separadas por periodos de reposo de 1 min en hielo. La suspensión resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C para eliminar los restos celulares insolubles y las bolitas, y el sobrenadante se empleó como extracto celular para realizar los ensayos de actividad lactato deshidrogenasa y medida de la concentración de proteína.

60

65

Medida de la actividad lactato deshidrogenasa: Se realizó según el procedimiento descrito por Boumerdassi y Cols. (Boumerdassi, H. y Cols. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63: 2293-2299), mediante la medida de la disminución de la absorbancia a 340 nm resultante de la oxidación del NADH. El ensayo se realizó a 30°C en tampón Tris-maleato 50 mM (pH 7,0) conteniendo 100 μ L de extracto celular, piruvato sódico 10 mM, fructosa-1,6-difosfato 1 mM, y NADH 0,15 mM. Las actividades enzimáticas fueron corregidas mediante la sustracción de las actividades NADH oxidasa, determinadas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia del sustrato piruvato sódico. Una unidad de actividad lactato deshidrogenasa es la cantidad de enzima que bajo las condiciones de ensayo reduce 1 μ mol de piruvato a lactato por minuto.

Medida de la actividad NADH oxidasa: Se realizó mediante la medida de la disminución de la absorbancia a 340 nm resultante de la oxidación del NADH. El ensayo se realizó a 30°C en tampón Tris-maleato 50 mM (pH 7,0) conteniendo 100 μ L de extracto celular, y NADH 0,15 mM. Una unidad de actividad NADH oxidasa es la cantidad de enzima que bajo las condiciones de ensayo oxida 1 μ mol de NADH a NAD⁺ por minuto.

Medida de la concentración de biomasa: La concentración de biomasa (en mg/mL) se determinó mediante la medida de la absorbancia a 600 nm de suspensiones celulares convenientemente diluidas. La absorbancia a 600 nm se relacionó con la concentración de biomasa de la suspensión celular tras lavado de ésta con agua y medida del peso seco de la suspensión resultante por calentamiento a 80°C hasta peso constante.

Medida de la concentración de proteína: La concentración de proteína en los extractos celulares se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254), utilizando lisozima como patrón.

Ejemplo 1

Obtención de la cepa mutante deficiente en la actividad enzimática lactato deshidrogenasa y superproductora de acetoina L. lactis subsp. lactis CML B4

Una colonia de la cepa de tipo silvestre *L. lactis* subsp. *lactis* NCIMB 702118 se cultivó a 30°C (250 rpm) en un frasco conteniendo 10 mL de medio M17 suplementado con glucosa al 1% durante 24 horas. Las células se lavaron a continuación en tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7,5) dos veces y se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón. A esta suspensión celular se añadieron 120 μ L del mutágeno químico metanosulfonato de etilo y se incubó a 25°C con suave agitación durante 15 min. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con 10 mL del mismo tampón fosfato dos veces, se resuspendieron en 10 mL de medio M17 con glucosa al 1% y la suspensión se incubó a 30°C con agitación durante 1 hora. Finalmente, cantidades apropiadas de esta suspensión o de diluciones suyas, tales que dieran lugar a 400-500 colonias por placa, se extendieron sobre placas del medio de selección. El medio de selección empleado fue un medio derivado del medio M17 con una menor capacidad tamponante, ya que contenía tan sólo un 5% (0,95 g/L) del glicerofosfato sódico de éste, y que además estaba suplementado con 10 g/L de 2,3,5-trifenil tetrazolio. En este medio las cepas con una actividad lactato deshidrogenasa de tipo silvestre forman colonias de color ligeramente rosado, mientras que las cepas con una actividad lactato deshidrogenasa reducida forman colonias de color rojo/pardo.

Se analizaron alrededor de 26.000 colonias, obteniéndose cuatro colonias de color rojo/pardo en el medio de selección, que se aislaron y analizaron para determinar su actividad lactato deshidrogenasa y su capacidad de producción de acetoina. De estas cuatro colonias se seleccionó finalmente la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* CML B4 puesto que era la que mostraba los mayores niveles de producción de acetoina. En las tablas 1 y 2 se muestra una comparación entre esta cepa mutante y la cepa de tipo silvestre original.

TABLA 1

Actividades lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH oxidasa (NOX) presentes en extractos celulares de las cepas de tipo silvestre y mutante. ¹Actividad enzimática expresada como tanto por ciento con respecto a la actividad de la cepa de tipo silvestre

Cepa	Tipo	LDH (U/mg prot.)	LDH (%) ¹	NOX (U/mg prot.)	NOX (%) ¹
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCIMB 702118	Tipo silvestre	9,48	100	0,13	100
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CML B4	Mutante LDH	0,64	7	0,63	485

TABLA 2

Producción de acetoína por cultivos de 24 horas de las cepas de tipo silvestre y mutante en medio M17 suplementado con glucosa al 1%. ¹Relación de la acetoína producida con respecto a la producida por la cepa de tipo silvestre. ²Se expresa en peso seco

Cepa	Tipo	Concentración de acetoína		Biomasa (mg/mL) ²
		Absoluta (mM)	Relativa ¹	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCIMB 702118	Tipo silvestre	3,35	1,00	1,11
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CML B4	Mutante LDH	45,01	13,44	1,36

Ejemplo 2

Proceso de producción de acetoína mediante fermentación a pH 5,5 de la cepa superproductora *L. lactis* subsp. *lactis* CML B4

Un fermentador conteniendo 1 L de medio M17 doblemente concentrado suplementado con 100 g de glucosa fue inoculado con 20 mL de un precultivo de 16 horas de la cepa CML B4 en medio M17 suplementado con glucosa a 10 g/L. La fermentación se realizó a 30°C; pH 5,5; concentración de oxígeno disuelto, 30%; velocidad de agitación, 500 rpm. El valor de pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 5 M.

La concentración de acetoína máxima en el medio, alcanzada a las 27 horas de cultivo, fue de 260 mM, con una producción total de 25,20 g a partir de 100 g de glucosa, lo que representa un rendimiento del 51,5% con respecto al máximo teórico para esa cantidad de glucosa.

Ejemplo 3

Proceso de producción de acetoína mediante fermentación a pH 6,0 de la cepa superproductora *L. lactis* subsp. *lactis* CML B4

Un fermentador conteniendo 1 L de medio M17 doblemente concentrado suplementado con 100 g de glucosa fue inoculado con 20 mL de un precultivo de 16 horas de la cepa CML B4 en medio M17 suplementado con glucosa a 10 g/L. La fermentación se realizó a 30°C; pH 6,0; concentración de oxígeno disuelto, 30%; velocidad de agitación, 500 rpm. El valor de pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 5 M.

La concentración de acetoína máxima en el medio, alcanzada a las 27 horas de cultivo, fue de 298 mM, con una producción total de 30,20 g a partir de 100 g de glucosa, lo que representa un rendimiento del 61,7% con respecto al máximo teórico para esa cantidad de glucosa.

Ejemplo 4

Proceso de producción de acetoína mediante fermentación a pH 6,5 de la cepa superproductora *L. lactis* subsp. *lactis* CML B4

Un fermentador conteniendo 1 L de medio M17 doblemente concentrado suplementado con 100 g de glucosa fue inoculado con 20 mL de un precultivo de 16 horas de la cepa CML B4 en medio M17 suplementado con glucosa a 10 g/L. La fermentación se realizó a 30°C; pH 6,5; concentración de oxígeno disuelto, 30%; velocidad de agitación, 500 rpm. El valor de pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 5 M.

La concentración de acetoína máxima en el medio, alcanzada a las 29 horas de cultivo, fue de 425 mM, con una producción total de 39,32 g a partir de 100 g de glucosa, lo que representa un rendimiento del 80,3% con respecto al máximo teórico para esa cantidad de glucosa.

65

Ejemplo 5

Proceso de producción de acetoína mediante fermentación a pH 7,0 de la cepa superproductora L. lactis subsp. lactis CML B4

5

Un fermentador conteniendo 1 L de medio M17 doblemente concentrado suplementado con 100 g de glucosa fue inoculado con 20 mL de un precultivo de 16 horas de la cepa CML B4 en medio M17 suplementado con glucosa a 10 g/L. La fermentación se realizó a 30°C; pH 7,0; concentración de oxígeno disuelto, 30%; velocidad de agitación, 500 rpm. El valor de pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 5 M.

10

La concentración de acetoína máxima en el medio, alcanzada a las 29 horas de cultivo, fue de 398 mM, con una producción total de 37,17 g a partir de 100 g de glucosa, lo que representa un rendimiento del 75,9% con respecto al máximo teórico para esa cantidad de glucosa.

15

Ejemplo 6

Proceso de producción de acetoína mediante fermentación a pH 6,5 y agitación a 750 rpm de la cepa superproductora L. lactis subsp. lactis CML B4

20

Un fermentador conteniendo 1 L de medio M17 doblemente concentrado suplementado con 100 g de glucosa fue inoculado con 20 mL de un precultivo de 16 horas de la cepa CML B4 en medio M17 suplementado con glucosa a 10 g/L. La fermentación se realizó a 30°C; pH 6,5; concentración de oxígeno disuelto, 30%; velocidad de agitación, 750 rpm. El valor de pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 5 M.

25

La concentración de acetoína máxima en el medio, alcanzada a las 20 horas de cultivo, fue de 461 mM, con una producción total de 43,06 g a partir de 100 g de glucosa, lo que representa un rendimiento del 87,9% con respecto al máximo teórico para esa cantidad de glucosa.

30

Ejemplo 7

Proceso de producción de acetoína mediante fermentación en semicontínuo de la cepa superproductora L. lactis subsp. lactis CML B4

35

Un fermentador conteniendo 1 L de medio M17 doblemente concentrado suplementado con 100 g de glucosa fue inoculado con 20 mL de un precultivo de 16 horas de la cepa CML B4 en medio M17 suplementado con glucosa a 10 g/L. A las 20 horas de cultivo, tras agotarse la glucosa incluida inicialmente, se suministraron al medio otros 100 g de glucosa. La fermentación se realizó a 30°C; pH 6,5; concentración de oxígeno disuelto, 30%; velocidad de agitación, 750 rpm. El valor de pH se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 5 M.

40

La concentración de acetoína máxima en el medio, alcanzada a las 28 horas de cultivo, fue de 671 mM, con una producción total de 72,42 g a partir de 200 g de glucosa, lo que representa un rendimiento del 74,0% con respecto al máximo teórico para esa cantidad de glucosa.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa bacteriana de *Lactococcus lactis lactis*, derivada de la cepa silvestre NCIMB702118, **caracterizada** porque su actividad lactato deshidrogenasa se encuentra en un rango de entre 0,50-0,75 U/mg, que ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número CECT 7512.
- 10 2. Cepa bacteriana según la reivindicación 1, cuya actividad NADH oxidasa se encuentra en un rango de entre 0,60-0,70 U/mg.
- 15 3. Cepa bacteriana según alguna de las reivindicaciones 1 ó 2 cuya producción de acetoína se encuentra en un rango de entre 45-461 mM en el medio de cultivo.
- 20 4. Cepa bacteriana según alguna de las reivindicaciones 1 ó 2 cuya producción de acetoína es superior a 70 g/l en el medio de cultivo, para cultivos en semicontínuo.
- 25 5. Procedimiento de producción de acetoína, que comprende la fermentación aeróbica de carbohidratos por una cepa bacteriana según la reivindicación 1.
- 30 6. Procedimiento de producción de acetoína según la reivindicación 5 que comprende los pasos de:
- (a) Precultivo de una cepa según la reivindicación 1.
 - (b) Inoculación de un medio rico en carbohidratos con el precultivo obtenido en (a)
 - (c) Fermentación de los carbohidratos del medio inoculado en (b) a 15-40°C; pH 5,5-7,0
 - (d) Separación del medio fermentado en (c) de las células.
 - (e) Opcionalmente, purificación de la acetoína vertida al medio durante la fermentación (c).
- 35 7. Procedimiento de producción de acetoína según alguna de las reivindicaciones 5 ó 6, donde el carbohidrato utilizado comprende moléculas de glucosa, fructosa o sacarosa.
- 40 8. Procedimiento de producción de acetoína según alguna de las reivindicaciones 5-7, donde el paso (c) de fermentación se realiza en un rango de saturación de 02 de entre el 30-100%.
- 45 9. Procedimiento de producción de acetoína según alguna de las reivindicaciones 5-7, donde la concentración inicial de carbohidrato es igual o superior a 100 g/L.
- 50
- 55
- 60
- 65

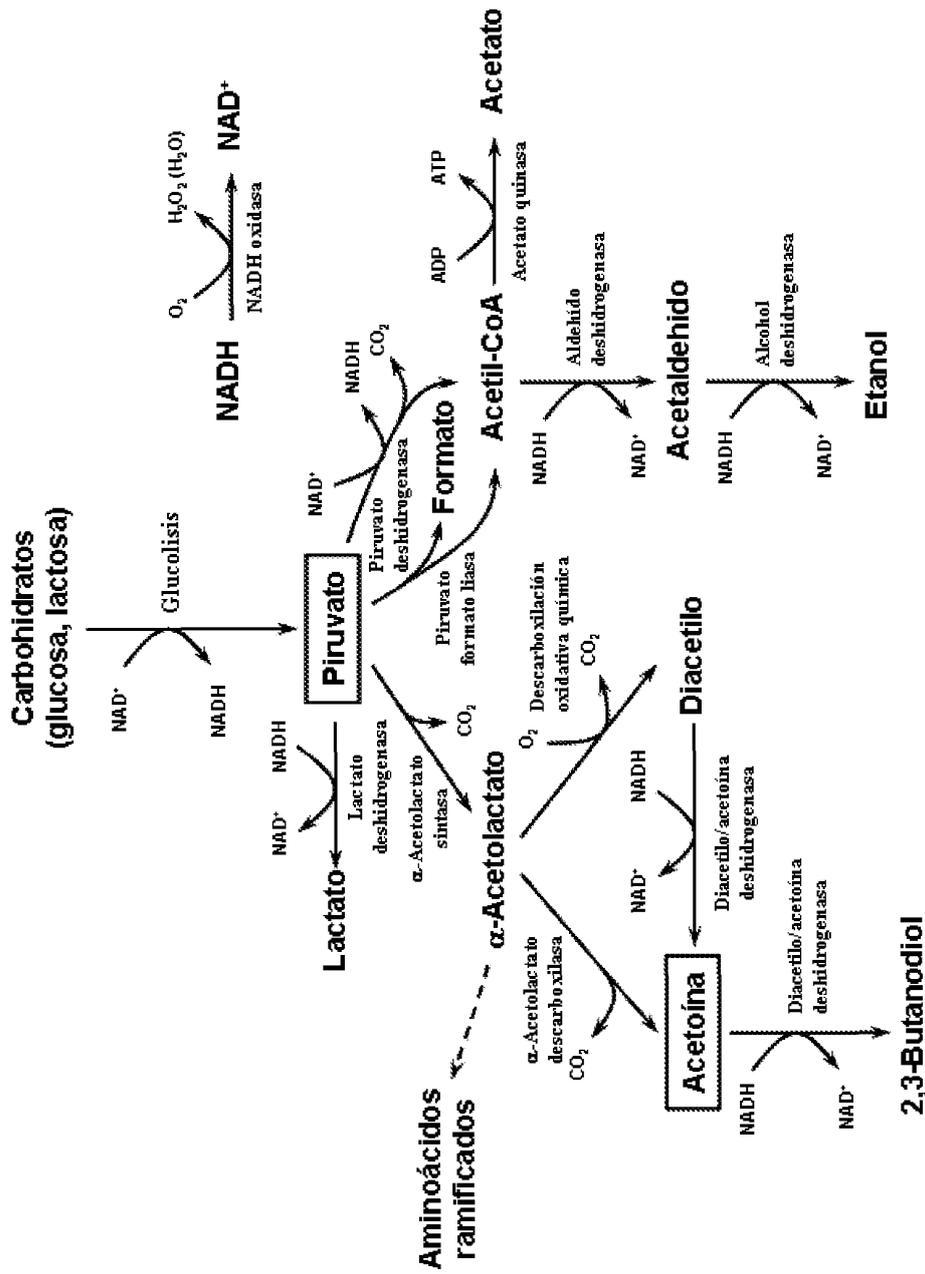


Figura 1. Rutas del metabolismo del piruvato en la bacteria *Lactococcus lactis*.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930561

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.08.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9807843 A1 (HANSENS LAB et al.) 26.02.1998, todo el documento.	1-9
A	FR 2777905 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH) 29.10.1999, todo el documento.	1-9
A	EP 0430406 A2 (MEIJI MILK PROD CO LTD) 05.06.1991, todo el documento.	1-9
A	KLEEREBEZEM, M et al.: "Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory: Rerouting of Carbon Metabolism in <i>Lactococcus lactis</i> by Metabolic Engineering", <i>Enz. Microbiol. Technol.</i> (2000), vol. 26, pp.: 840-848; todo el documento.	1-9
A	BOUMERDASSI, H. et al.: "Effect of Citrate on Production of Diacetyl and Acetoin by <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CNRZ 483 Cultivated in the Presence of Oxygen", <i>J. Dairy Sci.</i> , (1997), vol. 80, pp.: 634-639; todo el documento.	1-9
A	MONNET, C et al.: "Selection and Properties of <i>Lactobacillus</i> Mutants Producing +/- Acetolactate", <i>J. Dairy Sci.</i> , (1998), vol. 81, pp.: 2096-2102; todo el documento.	1-9
A	LÓPEZ DE FELIPE, F et al.: "Pyruvate Flux Distribution in NADH-Oxidase-Overproducing <i>Lactococcus lactis</i> Strain as a Function of Culture Conditions", <i>FEMS Microbiology Letters</i> , (1999), vol. 179, pp.: 461-466; todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.01.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/01 (01.01.2006)

C12P7/26 (01.01.2006)

C12N1/20 (01.01.2006)

C12R1/46 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9807843 A1 (HANSENS LAB et al.)	26.02.1998
D02	FR 2777905 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH)	29.10.1999
D03	EP 0430406 A2 (MEIJI MILK PROD CO LTD)	05.06.1991
D04	KLEEREBEZEM, M et al.: "Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory: Rerouting of Carbon Metabolism in <i>Lactococcus lactis</i> by Metabolic Engineering", <i>Enz. Microbiol. Technol.</i> (2000), vol. 26, pp.: 840-848; todo el documento.	
D05	BOUMERDASSI, H. et al.: "Effect of Citrate on Production of Diacetyl and Acetoin by <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CNRZ 483 Cultivated in the Presence of Oxygen", <i>J. Dairy Sci.</i> , (1997), vol. 80, pp.: 634-639; todo el documento.	
D06	MONNET, C et al.: " Selection and Properties of <i>Lactobacillus</i> Mutants Producing +/-Acetolactate", <i>J. Dairy Sci.</i> , (1998), vol. 81, pp.: 2096-2102; todo el documento.	
D07	LÓPEZ DE FELIPE, F et al.: "Pyruvate Flux Distribution in NADH-Oxidase-Overproducing <i>Lactococcus lactis</i> Strain as a Function of Culture Conditions", <i>FEMS Microbiology Letters</i> , (1999), vol. 179, pp.: 461-466; todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica una nueva cepa de *Lactococcus lactis lactis* derivada de la cepa silvestre NCIMB702118 con una elevada tasa de producción de acetoína, así como un procedimiento para la producción de dicha sustancia mediante fermentación por dicho microorganismo.

La acetoína (3-hidroxi-2-butanona o acetilmetilcarbinol) es un compuesto orgánico que, junto con el diacetilo, es el que confiere el típico aroma a mantequilla presente en los derivados lácteos (mantequilla, nata y algunos quesos).

D01-D07 describen el estado de la técnica anterior. Se refieren a otras cepas de *Lactococcus lactis* diferentes a las de la invención y a estudios sobre el metabolismo de la acetoína y cómo le afectan cambios en las actividades de lagunas enzimas.

Sin embargo, en ninguno de estos documentos se anticipa el contenido de las reivindicaciones de la solicitud. Por otro lado, de lo revelado en D01-D07 tampoco se desprende, de forma obvia para un experto en la técnica, el objeto de la invención reivindicado en la solicitud.

Así pues, se considera que las reivindicaciones 1-9 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva.