

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 899**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2009 PCT/FR2009/001080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10031916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2009 E 09740346 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2329008**

54 Título: **Nuevas cepas de levaduras para la producción de alcohol**

30 Prioridad:

16.09.2008 FR 0805056

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

07.11.2017

73 Titular/es:

LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)

41, rue Etienne Marcel

75001 Paris, FR

72 Inventor/es:

**COLAVIZZA, DIDIER y
TOUSSAINT, RENAUD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 640 899 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

Nuevas cepas de levaduras para la producción de alcohol

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a nuevas cepas de levaduras y a levaduras procedentes de estas nuevas cepas destinadas a la producción de alcohol, así como a un procedimiento de obtención de dichas cepas.

Antecedentes tecnológicos

10 Las levaduras sufren con frecuencia mutaciones durante su multiplicación y durante su uso en la fermentación, en particular a escala industrial. Sin embargo, estas levaduras en general conservan un fenotipo normal, porque con frecuencia se trata de mutaciones recesivas y porque las cepas industriales habitualmente son aneuploides o poliploides (The Alcohol Textbook, Ed Jacques (2003)).

15 El reciclaje de levaduras se usa con frecuencia en la fermentación alcohólica. El reciclaje de levaduras consiste en varios usos sucesivos de las levaduras, sin volver a partir de las levaduras o la cepa de partida. Así, todas o una parte de las levaduras procedentes de una fermentación i son usadas para una fermentación posterior $i+1$; después todas o partes de las levaduras procedentes de la fermentación $i+1$ son usadas para una fermentación $i+2$, y así sucesivamente.

El reciclaje de levaduras, llamado a veces "subcultivo en serie" en la bibliografía, es una técnica que expone a la levadura a una gran cantidad de tensiones que pueden conllevar a mutaciones de su patrimonio genético y a derivados genéticos.

20 En sus trabajos, Powell y Diacetis (2007, *J. Inst. Brew.* 1131(1), 67-74) estudian el impacto del reciclaje de levaduras de cerveza en su fenotipo. Al final de cada fermentación, se extrae una parte de la biomasa de levaduras para realizar la siguiente fermentación. Powell y Diacetis no han observado ninguna alteración en las características de la fermentación de levaduras en el transcurso de los sucesivos subcultivos, en alrededor de 135 generaciones.

25 Verma et al. (1983) por otro lado, han estudiado el interés del reciclaje de diferentes levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* en el marco de la producción de etanol. Después de cada fermentación alcohólica, las levaduras son subcultivadas en vista de una nueva fermentación, y se mide la cantidad de alcohol producida al final de cada fermentación. Los autores han destacado varias cepas de levaduras capaces de experimentar de 6 a 10 subcultivos sucesivos sin que su producción de alcohol se altere sensiblemente.

Así pues, en la bibliografía se ha estudiado la estabilidad de las levaduras en términos de la producción de alcohol en el marco del reciclaje de levaduras en la fermentación alcohólica.

30 Cuando se multiplica en un procedimiento industrial clásico, la levadura más eficaz, en términos de producción de alcohol, que conoce la empresa solicitante, muestra a veces, no obstante, disminuciones considerables de la cantidad de alcohol producida. Sin embargo, la multiplicación de las levaduras a escala industrial a partir de una cepa de levadura debe conducir a una levadura de calidad fiable. Por "calidad fiable" se entiende aquí que la cantidad de alcohol producido por la levadura, en un esquema de fermentación alcohólica dada, es relativamente constante.

Por otro lado, el mercado de la levadura dirigido a la producción de alcohol está continuamente demandando levaduras más eficaces en términos de cantidad de alcohol producido.

Por lo tanto, hay una necesidad real de proporcionar nuevas cepas de levaduras que den levaduras de calidad fiable, y preferiblemente eficaces en términos de cantidad de alcohol producido.

40 Resumen de la invención

Un primer objeto de la invención es proporcionar nuevas cepas de levaduras estables.

La presente invención tiene por lo tanto como objeto una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* estable seleccionada entre la cepa depositada en la CNCM con el número I-4073, la cepa depositada en la CNCM con el número I-4074 o la cepa depositada en la CNCM con el número I-4075.

45 Un segundo objeto de la invención es proporcionar un nuevo procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- cruce de una cepa de *Saccharomyces* inestable con ella misma o con otra cepa de *Saccharomyces*, para obtener al menos un híbrido,

- cultivo de al menos un híbrido, para obtener una población de levaduras R0,

50 - realización de n subcultivos sucesivos de la población de levaduras R0, siendo n un número entero superior o igual

- a 6, para obtener una población de levaduras R_n,
- medición de la producción de alcohol de dicha población R₀ y de la producción de alcohol de dicha población R_n,
 - selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población R_n es superior o igual a 95% la de la población R₀, para obtener cepas de levaduras estables.
- 5 La presente invención tiene en particular por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables como se han definido anteriormente, que comprende una etapa complementaria de selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población R₀ es superior o igual a 95% la de una población R₀ de la cepa depositada en la CNCM el 4 de septiembre de 2008, con el número I-4072.
- 10 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables como se ha definido anteriormente, que comprende una etapa complementaria de selección de al menos un híbrido que tenga un rendimiento de biomasa superior o igual a 90% el rendimiento de la biomasa de la cepa I-4072.
- La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables como se ha definido anteriormente, caracterizado por que la etapa de cruzamiento de las cepas de levaduras comprende las siguientes etapas:
- 15 - esporulación de dicha cepa de *Saccharomyces* inestable y opcionalmente de dicha otra cepa de *Saccharomyces*, para obtener segregantes,
- cultivo de cada segregante, para obtener una población R₀ para cada segregante,
 - realización de m subcultivos sucesivos de cada segregante, para obtener una población R_m de cada segregante, siendo m un número entero superior o igual a 6,
- 20 - medición de la producción de alcohol de la población R₀ y la de la producción de alcohol de la población R_m de cada segregante,
- selección de los segregantes para los que:
 - la producción de alcohol de la población R_m es superior o igual a 70% de la de la población R₀ de dicho segregante y
- 25 - la producción de alcohol de la población R_m es igual o superior a 85% la de la una población R₀ de la cepa I-4072,
- para obtener segregantes estables y eficaces, y
- cruce de segregantes estables y eficaces procedentes de dicha cepa inestable con segregantes estables y eficaces de signo opuesto procedentes de dicha cepa inestable o de dicha otra cepa, para obtener al menos un híbrido.
- 30 La presente invención tiene por objeto en particular un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables como se ha definido anteriormente, en el que dicha cepa de levadura inestables es la cepa I-4072.
- La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables como se ha definido anteriormente, en el que dicha otra cepa se selecciona de entre la cepa I-4071, la cepa I-4073, la cepa I-4074 o la cepa I-4075.
- 35 Un tercer objeto de la invención se refiere a una cepa de levadura que se puede obtener por el procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables como se ha definido anteriormente.
- Un cuarto objeto de la invención es proporcionar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada de una cepa como la definida anteriormente, caracterizada por que:
- 40 - la producción de alcohol de una población R_n de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R₀ de dicha cepa derivada, y/o
- la producción de alcohol de una población R₀ de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R₀ de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072,
- procediendo la población R_n de n subcultivos sucesivos de la población R₀, siendo n un número entero superior o igual a 6.
- 45 Un quinto objeto de la invención es proporcionar un nuevo procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa de levadura, que comprende las etapas de:
- cultivo de dicha cepa, para obtener una población de levaduras R₀,

- realización de n subcultivos sucesivos de la población de levaduras R0, siendo n un número entero superior o igual a 6, para obtener una población de levaduras Rn,

- medición de la producción de alcohol de dicha población R0 y de la de la producción de alcohol de dicha población Rn,

- 5 - calificación de dicha cepa de “estable” si la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0.

Un sexto objeto de la invención se refiere a una levadura obtenida por cultivo de una cepa de levadura como la definida anteriormente.

- 10 La presente invención tiene en particular por objeto una levadura como la definida anteriormente, caracterizada por que su producción de alcohol es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una levadura procedente de la cepa I-4072.

La presente invención tiene también por objeto una levadura como la definida anteriormente, caracterizada por que está en forma de crema de levadura, levadura prensada, levadura seca o levadura congelada.

- 15 Un séptimo objeto de la invención se refiere al uso de una levadura como se ha definido anteriormente para producir alcohol.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene por objeto proporcionar nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y nuevas levaduras procedentes de estas cepas destinadas a la producción de alcohol, siendo dichas levaduras de calidad fiable y, preferiblemente, eficaces en términos de cantidad de alcohol producido.

- 20 Para obtener una levadura de calidad fiable, hay que disponer de una cepa de levadura estable.

Una cepa de levadura estable indica aquí una cepa que da levaduras cuya producción de alcohol es relativamente estable a lo largo de las generaciones.

Para obtener una levadura eficaz, en términos de cantidad de alcohol producido, hay que disponer de una cepa de levadura eficaz en términos de cantidad de alcohol producido.

- 25 Las expresiones “producción de alcohol”, “producción de etanol”, “cantidad de alcohol producido” y “cantidad de etanol producido” son sinónimas aquí.

Cualquier cepa que no responda a la definición de una cepa estable se califica de cepa inestable.

- 30 De forma sorprendente e inesperada, la empresa solicitante ha demostrado que en el transcurso de las multiplicaciones de levaduras a escala industrial, a partir de la cepa I-4072, aparecen variantes cuya producción de alcohol es fiable. Al cabo de un determinado número de generaciones, la proporción creciente de variantes se traduce en una disminución considerable de la cantidad de alcohol producido.

Sin embargo, este problema de estabilidad en términos de producción de alcohol, que aparece en el transcurso de la multiplicación de levaduras, no se ha puesto nunca de manifiesto en la bibliografía.

- 35 En efecto, los documentos de la técnica anterior abordan el problema de la estabilidad de las cepas solamente en el marco del reciclaje de levaduras entre varias fermentaciones alcohólicas.

Por lo tanto existe la necesidad de proporcionar un procedimiento que permita distinguir las cepas de levaduras estables de las cepas de levaduras inestables.

Con el fin de poder verificar que una cepa de levadura es estable, en términos de producción de alcohol, la empresa solicitante ha elaborado un nuevo procedimiento que permite evaluar el carácter estable de una cepa.

- 40 Este procedimiento original de evaluación de la estabilidad de una cepa de levadura se basa en la realización de varios subcultivos sucesivos a partir de la cepa que se va a evaluar, con el fin de obtener una multiplicación de las levaduras que imita la obtenida durante una multiplicación a escala industrial.

El procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa de levadura según la invención, implica una combinación original de dos etapas:

- 45 - una primera etapa que consiste en varios subcultivos sucesivos a partir de la cepa de partida, y
- una segunda etapa de comparación de la producción de alcohol de las levaduras obtenidas después de los subcultivos sucesivos con la de la cepa de partida que se va a evaluar.

Así pues, si la producción de alcohol de la población de levaduras obtenida después de los subcultivos no ha disminuido sensiblemente en relación con la producción de alcohol de la cepa de partida que se va a evaluar, la cepa se califica como cepa estable.

5 La primera etapa de subcultivos sucesivos conduce, preferiblemente, a un número de generaciones de levaduras superior o igual al obtenido después de una multiplicación de las levaduras a escala industrial.

El procedimiento de evaluación de la estabilidad de la cepa según la invención presenta numerosas ventajas. Se trata en particular de un procedimiento rápido, que da resultados fiables, y que se puede llevar a cabo en el laboratorio.

10 La aplicación del procedimiento según la invención proporciona una ventaja considerable para un empresario, a la vez en términos de tiempo, coste y calidad de sus productos, evitando en particular realizar varias multiplicaciones industriales de una cepa inestable.

La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa de levadura, que comprende las etapas de:

- cultivo de dicha cepa, para obtener una población de levaduras R0,

15 - realización de n subcultivos sucesivos de la población de levaduras R0, siendo n un número entero superior o igual a 6, para obtener una población de levaduras Rn,

- medición de la producción de alcohol de dicha población R0 y de la producción de alcohol de dicha población Rn,

- calificación de dicha cepa de "estable" si la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0.

20 La expresión "cepa de levadura" indica una población relativamente homogénea de células de levadura.

Una cepa de levadura se obtiene a partir del aislamiento de un clon, siendo un clon una población de células obtenida a partir de una sola célula de levadura.

La cepa a evaluar es en particular una cepa destinada a la producción de levaduras usadas en destilería y/o vinificación y/o fabricación de cerveza y/o para la producción de bebidas fermentadas.

25 La cepa a evaluar preferiblemente es una cepa de *Saccharomyces*, en particular una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

El procedimiento según la invención no está limitado a la evaluación de la estabilidad de cepas de levadura. Se puede aplicar también a levaduras.

El término "levaduras" indica las levaduras obtenidas por cultivo a partir de una cepa de levadura.

30 El cultivo de la cepa de levadura a evaluar se realiza en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de la cepa de levadura.

El experto en la técnica puede determinar cuál es la composición de un medio adecuado para una cepa de levadura dada.

El cultivo de la cepa de levadura se puede llevar a cabo en medio líquido o en un medio de agar.

35 El cultivo de la cepa de levadura se lleva a cabo, preferiblemente, en un medio de agar.

El cultivo de la cepa de levadura se lleva a cabo en general a una temperatura comprendida entre 25°C y 35°C, preferiblemente de 28°C a 32°C.

El cultivo de la cepa de levadura se lleva a cabo en general a una temperatura de 30°C.

El cultivo de la cepa de levadura a evaluar conduce a una población de levaduras llamada R0.

40 Después, se llevan a cabo n subcultivos sucesivos a partir de la población R0. Esto significa que todo o una parte del cultivo que corresponde a la población de levaduras R0 se siembra para el cultivo siguiente que conduce a una población de levaduras G1; después todo o una parte del cultivo correspondiente a la población de levaduras G1 se siembra para el siguiente cultivo que conduce a una población de levaduras G2, y así sucesivamente hasta el cultivo que conduce a una población de levaduras Rn.

45 Los n subcultivos sucesivos se llevan a cabo, preferiblemente a intervalos de tiempo regulares.

Preferiblemente, los n subcultivos sucesivos son subcultivos diarios.

En un modo de realización preferido, los n subcultivos se llevan a cabo en el mismo medio y/o a la misma temperatura y/o con la misma cantidad de biomasa sembrada.

La biomasa se define como la masa de una población de levaduras.

5 Por ejemplo, después de cada subcultivo, una biomasa que corresponde a una masa seca de 0,05 mg de levaduras se siembra, preferiblemente en la superficie de un medio de agar.

Si es necesario, la biomasa recogida después de un subcultivo se puede conservar a 4°C durante varios días, por ejemplo, de 1 a 2 días, antes de sembrarla para el siguiente subcultivo.

Los subcultivos sucesivos se pueden llevar a cabo como se indica en el ejemplo 1.

10 El procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa conlleva un número de subcultivos superior o igual a 6, preferiblemente superior o igual a 10, más preferiblemente superior o igual a 12, todavía más preferiblemente superior o igual a 14.

En un modo de realización preferido, el procedimiento de evaluación según la invención implica 12 subcultivos sucesivos.

15 Se puede determinar el número de generaciones de levaduras obtenido después de n subcultivos sucesivos, calculando el número de generaciones obtenidas entre cada uno de los n subcultivos (véase, "Yeast Physiology and Biotechnology", 1998, Graeme M. Walker, publicado por Wiley, pág. 143).

El número de generaciones n_g entre dos subcultivos sucesivos i e i+1 se obtiene:

- midiendo la biomasa (X_i) sembrada para el 1^{er} subcultivo y la biomasa (X_{i+1}) recogida al final del 1^{er} subcultivo, después

20 - aplicando la siguiente fórmula:

$$n_g = 3,3 \log (X_{i+1}/X_i)$$

La biomasa X se puede expresar en número de células de levadura o en peso de materia seca.

El número de células de levadura se determina por métodos clásicos bien conocidos para el experto en la técnica, tales como recuento con microscopio o la citometría de flujo.

25 El peso de materia seca se determina por métodos clásicos bien conocidos para el experto en la técnica.

El número total de generaciones obtenidas después de n subcultivos sucesivos corresponde a la suma del número de generaciones obtenidas entre cada subcultivo.

A modo de ejemplo, el número de generaciones obtenidas en 12 subcultivos sucesivos diarios es del orden de aproximadamente 60 generaciones.

30 Se obtiene así un número de generaciones superior o igual al obtenido después de una multiplicación de levaduras a escala industrial, que en general es del orden de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 generaciones.

Este procedimiento original de la evaluación de la estabilidad de una cepa de levadura permite obtener así, a escala de laboratorio, un número de generaciones superior o igual al obtenido en una multiplicación industrial de levaduras.

35 Preferiblemente, las condiciones del procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa permiten obtener al menos 30 generaciones, preferiblemente al menos 40 generaciones, más preferiblemente al menos 50 generaciones, más preferiblemente todavía al menos 60 generaciones.

La medición de la producción de alcohol se lleva a cabo por cualquier medio adecuado conocido para el experto en la técnica. Se puede tratar de una medición directa del etanol producido o una medición indirecta por un parámetro correlacionado con la producción de alcohol.

40 Por ejemplo, la producción de alcohol se puede medir por cromatografía, en concreto por HPLC (Cromatografía líquida de alto rendimiento), un kit enzimático (por ejemplo, el kit de determinación de etanol de Boehringer), o una determinación mediante dicromato potásico.

La producción de alcohol se mide preferiblemente en un ensayo de fermentación alcohólica como se describe en el ejemplo 1.

45 En dicho ensayo, la cepa de levadura se multiplica en medio líquido, preferiblemente en dos tiempos: una etapa de precultivo seguido de una etapa de cultivo. A continuación se lleva a cabo la fermentación alcohólica, por ejemplo, a partir de 1 g de materia seca de levadura, a 35°C, en condiciones anaerobias, preferiblemente con agitación.

El sustrato para la fermentación alcohólica preferiblemente está en forma de sacarosa presente inicialmente en el medio de cultivo, por ejemplo, en una concentración de 240 g/l.

La medición de la producción de alcohol en general se expresa en porcentaje en volumen.

5 La curva de la fermentación alcohólica que representa la cantidad de alcohol producido en función del tiempo incluye en general tres fases:

- una fase de latencia, en el transcurso de la cual no hay producción de etanol,

- una fase exponencial, y

- una fase de meseta, correspondiendo esta fase a la cantidad máxima de etanol producido durante esta fermentación alcohólica.

10 La producción de alcohol se puede medir en un tiempo (t) que se sitúa al final de la fase exponencial o durante la fase de meseta.

La medición de la producción de alcohol se puede hacer a t_1 y/o t_2 , como se definen más adelante.

La medición de t_1 se sitúa al final de la fase exponencial, en un tiempo superior o igual al que corresponde a 95% de la cantidad máxima de alcohol producido.

15 Esta medición en t_1 permite, en particular, evaluar la cinética de la producción de alcohol.

La medición en t_2 se sitúa durante la fase de meseta, es decir cuando la fermentación alcohólica ha terminado.

El final de la fermentación alcohólica corresponde al momento en el que ya no hay azúcar residual en el medio que pueda ser fermentado por la levadura.

Esta medición en t_2 permite también evaluar el volumen máximo de alcohol producido.

20 A modo de ejemplo, en las condiciones definidas en los ejemplos, la producción de alcohol se puede medir en $t_1 = 48$ h y/o en $t_2 = 72$ h.

La última etapa del procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa consiste en calificar de cepa estable a una cepa cuya producción de alcohol de su población R_n es superior o igual al 95% de la producción de alcohol de su población R_0 .

25 La cepa se califica en concreto de cepa estable cuando la producción de alcohol de la población R_n de dicha cepa es superior o igual a 97%, preferiblemente superior o igual a 99% de la producción de alcohol de su población R_0 .

Una cepa se califica de cepa inestable cuando la producción de alcohol de la población R_n de dicha cepa es inferior a 95% de la producción de alcohol de su población R_0 .

30 La aplicación del procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa según la invención permite confirmar que la cepa I-4072 es una cepa inestable: la producción de alcohol de su población R_{12} es igual a 49% en $t_1 = 48$ h y 46,9% en $t_2 = 72$ h de la producción de alcohol de su población R_0 (véase el ejemplo 1).

Por otra parte, la empresa solicitante también ha puesto a punto un procedimiento nuevo original de obtención de cepas de levaduras estables.

35 La aplicación de este procedimiento ha permitido en particular obtener las tres nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* depositadas el 4 de septiembre de 2008 en virtud del tratado de Budapest ante la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia) con los números I-4073, I-4074 y I-4075.

40 Por lo tanto, la presente invención tiene por objeto una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4073, la cepa depositada en la CNCM con el número I-4074 o la cepa depositada en la CNCM con el número I-4075.

Estas tres cepas de levaduras son a la vez estables y eficaces.

La estabilidad de estas cepas de levaduras se traduce por la pequeña desviación en la cantidad de alcohol producido, después de n subcultivos sucesivos, con respecto a la cepa de partida.

45 La evaluación de la estabilidad de las cepas según la invención se puede realizar como se ha descrito antes en el procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa.

La estabilidad de las tres cepas según la invención se traduce, por lo tanto, en una disminución de la producción de

alcohol inferior a 3% después de n subcultivos, mientras que una cepa inestable como la cepa de referencia I-4072 presenta una disminución de la producción de alcohol superior a 50% (véase el ejemplo 1).

La eficacia de las cepas de levaduras según la invención se traduce en una producción de alcohol de dichas cepas cercana a la de la cepa de referencia I-4072.

- 5 La eficacia de las tres cepas de levadura según la invención se traduce así en una producción de alcohol de dichas cepas superior o igual a 95% la de la cepa de referencia.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada el 4 de septiembre de 2008 ante la CNCM con el número I-4075 presenta en concreto las siguientes características:

- 10 - la producción de alcohol de la población R12 de dicha cepa es superior o igual a 97% de la producción de alcohol de la población R0 de dicha cepa, procediendo la población R12 de 12 subcultivos sucesivos diarios de la población R0, y

- la producción de alcohol de la población R0 de dicha cepa es superior o igual a 99% de la producción de alcohol de la población R0 de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072 (tras una medición a las 48 h).

- 15 La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada el 4 de septiembre de 2008 ante la CNCM con el número I-4073 presenta en concreto las siguientes características:

- la producción de alcohol de la población R12 de dicha cepa es superior o igual a 98% de la producción de alcohol de la población R0 de dicha cepa, procediendo la población R12 de 12 subcultivos sucesivos diarios de la población R0, y

- 20 - la producción de alcohol de la población R0 de dicha cepa es superior o igual a 99% de la producción de alcohol de la población R0 de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada el 4 de septiembre de 2008 ante la CNCM con el número I-4074 presenta en concreto las siguientes características:

- 25 - la producción de alcohol de la población R12 de dicha cepa es superior o igual a 98% de la producción de alcohol de la población R0 de dicha cepa, procediendo la población R12 de 12 subcultivos sucesivos diarios de la población R0, y

- la producción de alcohol de la población R0 de dicha cepa es superior o igual a 99% de la producción de alcohol de la población R0 de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072.

- 30 La presente invención tiene por lo tanto por objeto las tres cepas descritas antes y el conjunto de cepas que pertenecen a la misma familia, en particular todas las cepas derivadas que comparten las mismas propiedades que estas tres cepas.

Por otra parte, la presente invención tiene por objeto un nuevo procedimiento original de obtención de cepas de levaduras estables, basado en la selección de nuevas cepas que responden a la calificación de cepa estable en el procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa como se ha definido anteriormente.

Dicha selección se lleva a cabo en las nuevas cepas de levaduras obtenidas por técnicas clásicas.

- 35 Una técnica clásica consiste en una etapa de esporulación de levaduras para obtener segregantes, seguido de una etapa de cruce de los segregantes para obtener híbridos.

Los híbridos constituyen las cepas de levaduras que posteriormente son seleccionadas según el criterio de estabilidad.

- 40 La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- cruce de una cepa de *Saccharomyces* inestable con ella misma o con otra cepa de *Saccharomyces*, para obtener al menos un híbrido,

- cultivo de al menos un híbrido, para obtener una población de levaduras R0,

- 45 - realización de n subcultivos sucesivos de la población de levaduras R0, siendo n un número entero superior o igual a 6, para obtener una población de levaduras Rn,

- medición de la producción de alcohol de dicha población R0 y la de la producción de alcohol de dicha población Rn,

- selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 95%

la de la población R0, para obtener cepas de levaduras estables.

La etapa de cruce se lleva a cabo según técnicas clásicas, como las enseñadas en el capítulo 7 de "Sporulation and Hydrization of Yeast" de R.R. Fowell, de la obra de referencia "The Yeasts", Volumen 1, editado por A.H. Rose y J. S. Harrison, 1969-Academic Press.

- 5 Las etapas de cultivo de al menos un híbrido, realización de n subcultivos sucesivos y medición de la producción de alcohol son similares a las del procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa.

Las condiciones para llevar a cabo estas etapas son, por lo tanto, las mismas que las descritas anteriormente en el marco del procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa.

- 10 La última etapa del procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables consiste en seleccionar al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 95% de la de la población R0, constituyendo dicho híbrido una cepa de levadura estable.

Preferiblemente, la última etapa del procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables consiste en seleccionar al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 97% de la de la población R0.

- 15 La presente invención tiene en particular por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables como se han definido anteriormente, en el que la última etapa de la selección comprende la selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 97% de la de la población R0, preferiblemente superior o igual a 99% de la de la población R0.

- 20 Las cepas estables según la invención, la cepa inestable usada en la etapa de cruce y dicha otra cepa de *Saccharomyces* usada en la etapa de cruce pueden ser cepas homotáticas o heterotáticas.

En un modo de realización preferido de la invención, las cepas estables según la invención, la cepa inestable usada en la etapa de cruce y dicha otra cepa de *Saccharomyces* usada en la etapa de cruce son cepas heterotáticas.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras a la vez estables y eficaces en términos de producción de alcohol.

- 25 La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables tal como se han definido anteriormente, que comprende una etapa complementaria de selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población R0 es superior o igual a 95% la de la población R0 de la cepa I-4072.

- 30 Esta etapa complementaria de selección basada en el rendimiento en términos de producción de alcohol se lleva a cabo antes o después de la etapa de selección de híbridos según el criterio de estabilidad.

La presente invención tiene en particular por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables tal como se han definido anteriormente, en el que la etapa complementaria de selección comprende la selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población R0 es superior o igual a 97%, preferiblemente superior o igual a 99% la de la población R0 de la cepa I-4072.

- 35 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras a la vez estables y eficaces en términos de producción de alcohol y que tienen un buen rendimiento de biomasa.

Por "rendimiento" o "rendimiento de biomasa" o "rendimiento de la producción de biomasa" se indica aquí la relación de la masa de levadura producida respecto a la masa de azúcar usada durante la multiplicación de las levaduras.

- 40 La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables tal como se han definido anteriormente, que comprende una etapa complementaria de selección de al menos un híbrido que tiene un rendimiento de biomasa superior o igual a 90% del rendimiento de biomasa de la cepa I-4072, preferiblemente superior o igual a 95%, más preferiblemente superior o igual a 98%.

- 45 Esta etapa complementaria de selección basada en el rendimiento de biomasa se lleva a cabo antes o después de la etapa de selección de los híbridos por el criterio de estabilidad y, llegado el caso, antes o después de la etapa de selección basado en la eficacia en términos de producción de alcohol.

De forma ventajosa, el rendimiento de biomasa de las cepas según la invención es superior o igual a 90%, preferiblemente superior o igual a 95%, más preferiblemente superior o igual a 98% del rendimiento de biomasa obtenido con la cepa I-4072.

- 50 En un modo de realización preferido, el procedimiento de obtención de cepas de levaduras estables comprende una preselección a nivel de los segregantes.

Los segregantes obtenidos después de esporulación de las levaduras se seleccionan entonces basándose en la estabilidad y la eficacia.

La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de obtención de nuevas cepas de levaduras estables tal como se han definido anteriormente, caracterizadas por que la etapa de cruce de las cepas de levaduras comprende las siguientes etapas:

- 5 -
- esporulación de dicha cepa de *Saccharomyces* inestable y opcionalmente de dicha otra cepa de *Saccharomyces*, para obtener segregantes,
- cultivo de cada segregante, para obtener una población R0 para cada segregante,
- 10 - realización de m subcultivos sucesivos de cada segregante, para obtener una población Rm de cada segregante, siendo m un número entero superior o igual a 6,
- medición de la producción de alcohol de la población R0 y la de la producción de alcohol de la población Rm de cada segregante,
- selección de los segregantes para los que:
 - 15 - la producción de alcohol de la población Rm es superior o igual a 70% de la de la población R0 de dicho segregante y
 - la producción de alcohol de la población Rm es igual o superior a 85% de la de la una población R0 de la cepa I-4072,para obtener segregantes estables y eficaces, y
- cruce de segregantes estables y eficaces procedentes de dicha cepa inestable con segregantes estables y eficaces de signo opuesto procedentes de dicha cepa inestable o de dicha otra cepa, para obtener al menos un híbrido.

Las etapas de cultivo de cada segregante, de realización de m subcultivos sucesivos y de medición de la producción de alcohol son similares a las del procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa.

Las condiciones para llevar a cabo estas etapas son, por lo tanto, las mismas que las descritas anteriormente en el marco del procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa.

- 25 La etapa de selección de segregantes basada en la estabilidad y la eficacia en términos de producción de alcohol conduce a la obtención de segregantes estables y eficaces, según criterios menos selectivos que los aplicados a los híbridos o a las cepas de levaduras.

En un modo de realización particular del procedimiento de obtención de las cepas de levaduras estables, dicha cepa de levadura inestables es la cepa I-4072.

- 30 En un modo de realización particular del procedimiento de obtención de las cepas de levaduras estables, dicha otra cepa de levadura se selecciona entre la cepa I-4071, la cepa I-4073, la cepa I-4074 o la cepa I-4075.

Dicha otra cepa de levadura preferiblemente es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

La presente invención tiene también por objeto una cepa de levadura que se puede obtener por el procedimiento de obtención de las cepas como se ha definido anteriormente.

- 35 La presente invención tiene en concreto por objeto una cepa de levadura obtenida por el procedimiento de obtención de cepas tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención tiene también por objeto todas las cepas derivadas de cepas de levaduras estables según la invención que compartan las mismas propiedades.

- 40 Por la expresión "cepa derivada", se indica una cepa derivada por cualquier transformación cualquiera que sea, como por ejemplo uno o varios cruces y/o una o varias mutaciones y/o una o varias transformaciones genéticas.

Una cepa derivada por cruce se puede obtener por cruce de una cepa según la invención con la misma cepa, u otra cepa según la invención, u otra cepa cualquiera.

Una cepa derivada por mutación puede ser una cepa que sufre al menos una mutación espontánea en su genoma o al menos una mutación inducida, por ejemplo, por mutagénesis.

- 45 La o las mutaciones de la cepa derivada son silenciosas o no.

Por el término "mutagénesis", se indica a la vez la mutagénesis clásica obtenida por radiaciones o por agentes

químicos mutágenos y la mutagénesis de inserción por transposición o por integración de un fragmento de ADN exógeno.

La mutagénesis por radiaciones comprende el uso de rayos UV, X o gamma.

- 5 Los agentes químicos mutágenos son, por ejemplo, el EMS (sulfonato de etilo-metilo), EES (sulfonato de etilo-etilo), nitrosoguanidina, ácido nitroso, aflatoxina B1, hidroxilamina, 5-bromourecilo, 2-aminopurina, proflavina, acridina naranja.

Una cepa derivada por transformación genética es una cepa en la que se ha introducido un ADN exógeno.

Dicho ADN exógeno puede ser aportado por un plásmido.

Dicho ADN exógeno preferiblemente se integra en el genoma de la levadura.

- 10 La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada de una cepa de levadura estable tal como se ha definido anteriormente, caracterizada por que:

- la producción de alcohol de una población Rn de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0 de dicha cepa derivada, y/o

- 15 - la producción de alcohol de una población R0 de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0 de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072,

procediendo la población Rn de n subcultivos sucesivos de la población R0, siendo n un número entero superior o igual a 6.

El número de subcultivos es, preferiblemente, igual a 12, y se trata, preferiblemente, de subcultivos diarios.

- 20 La presente invención tiene en particular por objeto una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada de una cepa de levadura estable tal como se ha definido anteriormente, caracterizada por que:

- la producción de alcohol de una población Rn de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0 de dicha cepa derivada, preferiblemente superior o igual a 97%, más preferiblemente superior o igual a 99%, y

- 25 - la producción de alcohol de una población R0 de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0 de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072, preferiblemente superior o igual a 97%, más preferiblemente superior o igual a 99%,

procediendo la población Rn de n subcultivos sucesivos de la población R0, siendo n un número entero superior o igual a 6.

- 30 La invención tiene también por objeto un procedimiento de transformación de una cepa de levadura estable, para obtener una cepa derivada como se ha definido anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento de transformación una etapa de transformación de dicha cepa por al menos un cruce y/o al menos una mutación y/o al menos una transformación genética.

La presente invención tiene también por objeto una levadura obtenida por cultivo de una cepa de levadura tal como se ha definido anteriormente.

- 35 Las levaduras son producidas a partir de cepas de levadura estables según la invención, en concreto como se describe en el libro de referencia "Yeast Technology", 2ª edición, 1991, G. Reed y T.W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

La multiplicación de las levaduras, a escala industrial, comprende en general al menos las dos primeras etapas y la última etapa del siguiente conjunto de etapas:

- 40 - multiplicación de una cepa de levadura en varias fases, primero semianaerobia, y después aerobia,
- separación por centrifugación de la levadura así producida de su medio de cultivo, para obtener una crema de levadura líquida que contiene aproximadamente entre 12 y 25% de materia seca, incluso una cantidad más elevada de materia seca si la crema de levaduras se mezcla con productos osmolitos,
- 45 - filtración de la crema de levaduras líquida así obtenida, en general sobre un filtro rotatorio con vacío, para obtener una levadura fresca deshidratada que contiene de 26% a 35% de materia seca,
- amasado de dicha levadura fresca deshidratada, para obtener una masa homogénea,
- extrusión de la levadura así obtenida, para obtener

- una levadura prensada en forma de panes de levadura fresca o de levadura fresca desmenuzada, que contiene aproximadamente 30% de materia seca, o

- una levadura en forma de partículas, en general de gránulos, si la levadura está destinada a ser secada,

5 - opcionalmente, secado de forma controlada, en una corriente de aire caliente, por ejemplo, por fluidización, de las partículas de levaduras obtenidas por extrusión para obtener la levadura seca,

- envasado.

La etapa de secado preferiblemente es un secado rápido realizado en presencia de un emulsionante.

10 Entre los emulsionantes que se pueden usar durante la etapa de secado, se puede seleccionar el monoestearato de sorbitán, usado, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 1,0% (en peso, respecto al peso de la levadura seca).

Las levaduras según la invención son levaduras de calidad fiable, y, preferiblemente eficaces en términos de producción de alcohol.

Las levaduras según la invención se pueden usar en cualquier forma posible.

15 Por ejemplo, la presente invención tiene por objeto una levadura como se ha definido anteriormente, caracterizada por que está en forma de crema de levadura, levadura prensada, levadura seca o levadura congelada.

Las levaduras frescas se caracterizan por un contenido elevado de agua en comparación con las levaduras secas. Las levaduras frescas abarcan las cremas de levaduras o las levaduras prensadas.

Las cremas de levaduras, llamadas también "levaduras líquidas" son suspensiones acuosas de células de levadura que presentan una viscosidad de tipo crema.

20 Por crema de levadura se entiende una suspensión líquida, típicamente una suspensión acuosa, de células vivas de levadura, teniendo dicha suspensión un contenido en materia seca de al menos 12% en masa, en general comprendido de aproximadamente 12 a aproximadamente 50% en masa (definición entendida de crema de levadura).

25 Preferiblemente, la crema de levadura responde a la definición en sentido estricto, es decir, presenta un contenido de materia seca comprendido de aproximadamente 12 a aproximadamente 25% en masa, preferiblemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 22% en masa.

30 Entre las levaduras prensadas, se distinguen las levaduras prensadas en bloque compacto, llamadas también "panes de levadura" que se caracterizan por un contenido en materia seca comprendido de aproximadamente 26% a aproximadamente 35%, y las levaduras prensadas en gránulos que se caracterizan por un contenido en agua comprendido de aproximadamente 21% a aproximadamente 35%.

Las levaduras secas se caracterizan por un contenido en materia seca superior a aproximadamente 92%.

Las levaduras congeladas se caracterizan por un contenido en materia seca comprendido de aproximadamente 74% a aproximadamente 80%.

35 La levadura según la invención presenta, por lo tanto, características buscadas para una levadura destinada a la producción de alcohol, es decir, una calidad fiable y una producción de alcohol eficaz.

La presente invención tiene también por objeto una levadura tal como se ha definido anteriormente para producir alcohol.

Las condiciones de la fermentación alcohólica dependen en particular del tipo de aplicación buscada, por ejemplo, según se trate de una fermentación de tipo cervecera, vinificación o destilería.

40 Las condiciones de fermentación alcohólica las puede determinar fácilmente el experto en la técnica.

A modo de ejemplo, se puede hacer referencia a las condiciones de fermentación alcohólica descritas en el libro de referencia "Yeast Technology", 2ª edición, 1991, G. Reed y T.W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

Las levaduras según la invención son particularmente interesantes en las siguientes aplicaciones:

45 - el alcohol llamado "de beber", destinado a la fabricación de bebidas alcohólicas, y/o

- el alcohol industrial, destinado, por ejemplo, a los biocarburantes o a la industrias químicas.

La presente invención se va a ilustrar ahora con ayuda de los siguientes ejemplos que se dan a modo de ilustración y no son en modo alguno limitantes.

Los ejemplos describen en particular un procedimiento de obtención de cepas de levadura estables según la invención y sus características, así como las características de las levaduras obtenidas a partir de estas cepas.

5 **Ejemplo 1: Selección de cepas de levadura estables y sus características**

Material y métodos

1. Medios y productos

La composición de los medios de cultivo y la naturaleza de las enzimas usadas se indican a continuación.

Medio 1		Medio 2	
Extracto de levadura	3 g	Acetato sódico	6,5 g
Extracto de malta	3 g	agar	15 g
Peptona	5 g	pH: 6,5-7	
Glucosa	10 g	Agua csp 1 litro	
Agar	20 g	Esterilización: 20 minutos a 121°C	
pH: 6,2 +/- 0,2			
Agua csp 1 litro			
Esterilización: 20 minutos a 121°C			
Medio 3		Medio 4	
Melaza de caña	5 g	Sacarosa	100 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	500 mg	Extracto de levadura	20 g
Agar	30 g	MgSO ₄	1 g
pH ajustado 5,2-5,3 con H ₂ SO ₄ al 10%		KH ₂ PO ₄	1 g
Agua csp 1 litro		pH ajustado a 4,7 con ácido láctico	
Esterilización: 40 minutos a 121°C		Agua csp 1 litro	
		Esterilización: 30 minutos a 121°C	
Medio 5		Enzimas:	
Sacarosa	240 g	Zimoliasa 100000 a 20 mg/ml	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,7 g		
KCl	0,8 g		
Tween 80	0,5 ml		
Tampón de citrato	0,2 M		
Vitamina B1 (Tiamina)	4 mg		
Vitamina B6 (Piridoxina)	4 mg		
Ácido nicotínico	40 mg		
Biotina 0,01mg			
pH: 4,2			
Agua csp 1 litro			

10 El medio 1 es un medio de cultivo básico de agar que contiene los elementos necesarios para el crecimiento de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la invención.

El medio 2 es un medio de agar adecuado para la esporulación de levaduras.

El medio 3 es un medio de cultivo de agar adecuado para el crecimiento de levaduras. El medio 3 contiene melaza, el sustrato usado en general para la multiplicación industrial de levaduras.

15 El medio 4 es un medio de cultivo líquido de referencia adecuado para la multiplicación de levaduras.

El medio 5 es un medio de cultivo líquido adecuado para llevar a cabo una fermentación alcohólica.

ES 2 640 899 T3

La zimoliasa es una enzima usada después de la esporulación, con el fin de digerir parcialmente la pared de los ascomicetos para facilitar su disección.

2. Aislamiento de los segregantes

Etapa 1: Crecimiento de la cepa en el medio 1

- 5 Se siembra un inóculo de la cepa de partida (conservada a -80°C) en la superficie del agar en una placa de Petri. La placa de Petri después se incuba durante 24 horas a 30°C .

Etapa 2: Esporulación en el medio 2

Se siembra un inóculo del cultivo precedente en la superficie de agar de una placa de Petri.

- 10 La placa de Petri se incuba durante 96 horas a 25°C . La biomasa obtenida en la superficie de la placa a continuación se recoge en 500 μl de agua estéril. A 100 μl de esta suspensión se le añaden 25 μl de zimoliasa. La suspensión se incuba durante 30 minutos a 30°C , antes de extenderla sobre placa de agar de medio 1. Preferiblemente, la disección de las tétradas se lleva a cabo 20 minutos más tarde.

Etapa 3: Disección de las tétradas

- 15 Las tétradas son diseccionadas en el micromanipulador SINGER, y después la placa de Petri se incuba durante 24 horas a 30°C .

Etapa 4: Conservación de los segregantes

Los segregantes a continuación se conservan a -80°C en medio 1 que contiene 20% de glicerol.

3. Subcultivos sucesivos y número de generaciones

Etapa 1: Crecimiento en medio 1

- 20 Se siembra un inóculo de la cepa a ensayar (conservada a -80°C) en superficie de agar en una placa de Petri que contiene medio 1. A continuación la placa de Petri se incuba durante 24 horas a 30°C .

Etapa 2: subcultivos sucesivos en medio 3

La cepa a ensayar se subcultiva en la superficie de una placa de Petri que contiene medio 3 con ayuda de una punta de palillo. A continuación la placa de Petri se incuba durante 20 a 24 horas a 30°C .

- 25 Se repiten entonces las siguientes etapas 11 veces:

- subcultivo de la cepa a ensayar en la superficie de una placa de Petri que contiene medio 3 con ayuda de una punta de palillo,
- incubación de la placa de Petri durante 20 a 24 horas a 30°C .

Variante de la etapa 2

- 30 De forma alternativa, los subcultivos sucesivos en el medio 3 se pueden llevar a cabo según el siguiente protocolo.

La biomasa obtenida en la etapa 1 se recupera y se diluye en agua destilada, con el fin de obtener una suspensión de levaduras de 0,5 mg/ml. Se siembra entonces una placa de Petri que contiene medio 3 en la superficie con 100 μl de esta suspensión.

La placa de Petri se incuba durante 20 a 24 horas a 30°C .

- 35 Se repiten entonces las siguientes etapas 11 veces:

- la biomasa obtenida se recoge en 2 x 2,5 ml de agua destilada,
- se realizan diluciones con el fin de obtener una suspensión de levaduras de 0,5 mg/ml,
- a partir de esta suspensión, se siembra de nuevo una placa de Petri que contiene medio 3 en la superficie con 100 μl de dicha suspensión, y

- 40 - la placa de Petri se incuba durante 20 a 24 horas a 30°C .

Etapa 3: Cálculo del número de generaciones obtenidas en la etapa 2

Sea n_g el número de generaciones y X_0 la biomasa sembrada, la biomasa X_n obtenida después de n subcultivos

viene dada por la siguiente fórmula:

$$X_n = 2^{n_g} X_0$$

El número de generaciones se calcula, por lo tanto, aplicando la siguiente fórmula:

$$n_g = (\log X_t - \log X_0) / \log 2, \quad \text{siendo } n_g = 3,3 \log (X_n/X_0)$$

- 5 La biomasa se puede expresar en número de células o en peso de materia seca.

Con respecto al número de células, las células de levadura extraídas con una punta de palillo u obtenidas después de incubación en la placa de Petri, se ponen en suspensión en 1 ml de agua. A continuación se obtiene el número de células por medición en el citómetro de flujo.

- 10 Se obtienen aproximadamente 5 generaciones entre cada subcultivo, lo que corresponde en media a 60 generaciones en 12 subcultivos sucesivos.

Variante de la etapa 3

El número de generaciones obtenidas después de la variante de la etapa 2 se determina de la siguiente forma.

- 15 Se mide el peso de materia seca (X_0) de dicha suspensión de levaduras, así como el peso de materia seca (X_t) de la suspensión de levaduras recogida después de 20 a 24 horas de crecimiento. El peso de materia seca se mide después de deshidratación en una estufa a aproximadamente 105°C.

El número de generaciones se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$n_g = 3,3 \log (X_n/X_0)$$

se obtienen de 3 a 4 generaciones entre cada subcultivo, lo que corresponde de aproximadamente 36 a aproximadamente 48 generaciones en 12 subcultivos sucesivos.

- 20 4. Ensayo de fermentación alcohólica por medición del etanol producido

Etapa 1: Cultivo en el medio 1

Se siembra un inóculo de la cepa a ensayar (conservada a -80°C) en la superficie de una placa de Petri que contiene el medio 1. La placa de Petri se incuba durante 24 horas a 30°C.

Etapa 2: Precultivo en medio líquido en matraz de 50 ml

- 25 Se siembra un inóculo del cultivo precedente en el matraz de 50 ml que contiene 20 ml de medio 4. El matraz se incuba durante 24 horas a 26°C.

Etapa 3: Cultivo en medio líquido en matraz de 250 ml

Se siembran 6 ml de cultivo obtenido en la etapa precedente en un matraz de 250 ml que contiene 150 ml de medio 4. El matraz se incuba durante 20 horas a 26°C.

- 30 El cultivo obtenido se centrifuga a 4500 rpm durante 3 minutos, el líquido sobrenadante se elimina y el sedimento se vuelve a suspender en 100 ml de agua destilada estéril (lavado). La suspensión se centrifuga de nuevo a 4500 rpm durante 3 minutos y el sedimento se vuelve a poner en suspensión en 20 ml de agua destilada estéril.

Se mide el peso de materia seca.

Etapa 4: Fermentación alcohólica en matraz de fondo redondo de 4000 ml

- 35 Se siembra 1 g de materia seca de levadura de la suspensión obtenida en la etapa 3 en un matraz de fondo redondo de 4000 ml que contiene 1000 ml de medio 5.

El matraz de fondo redondo se incuba durante 72 horas a 35°C con agitación a 80 rpm.

Se extraen 10 ml de mosto de fermentación en $t = 0$, $t = 7$ horas, $t = 24$ horas, $t = 48$ horas y $t = 72$ horas.

- 40 El mosto de fermentación extraído se filtra (filtro de 0,2 μm) y la solución de fermentación así obtenida se conserva a -20°C.

A continuación se miden la concentración de azúcar, etanol y glicerol presentes en la solución de fermentación por HPLC (columna HPX87H).

Resultados

1. Selección de los segregantes

Se aislaron segregantes de las cepas depositadas el 4 de septiembre de 2008 en la CNCM con los números I-4071 y I-4072, como se indica en la sección "Material y métodos".

5 La etapa de esporulación conduce a la formación de ascomicetos que contienen 4 esporas haploides que son diseccionadas.

Cada espora haploide constituye un segregante.

Los segregantes procedentes de las dos cepas I-4071 y I-4072 se evalúan en términos de cantidad de alcohol producido y de la estabilidad.

10 Los resultados de 5 tétradas procedentes de la cepa I-4072 (numeradas de 1 a 5) se presentan en las tablas 1. a) a e).

Los resultados de 6 tétradas procedentes de la cepa I-4071 (numeradas de 6 a 11) se presentan en las tablas 2. a) a f).

Los valores dados en las tablas corresponden a la media obtenida de al menos tres ensayos independientes.

15 La fila (1) indica la producción de alcohol de la población R0 del segregante, expresada en % de la de la población R0 de la cepa I-4072 y por lo tanto indica el rendimiento del segregante.

La fila (2) indica la producción de alcohol de la población R12 del segregante, expresada en % de la de la población R0 de dicho segregante y por lo tanto indica la estabilidad del segregante.

Tabla 1. a)

tétrada 1	1a	1b	1c	1d
signo	a	a	α	α
(1)	77	97	64	101
(2)	103	88	108	77

Tabla 1. b)

tétrada 2	2a	2b	2c	2d
signo	a	a	α	α
(1)	100	65	73	100
(2)	68	96	101	80

20 Tabla 1. c)

tétrada 3	3a	3b	3c	3d
signo	a	a	α	α
(1)	98	82	97	66
(2)	82	100	60	99

Tabla 1. d)

tétrada 4	4a	4b	4c	4d
signo	a	a	α	α
(1)	75	94	98	71
(2)	98	100	88	100

Tabla 1. e)

tétrada 5	5a	5b	5c	5d
signo	a	a	α	α
(1)	99	97	65	68
(2)	109	67	121	103

Tabla 2. a)

tétrada 6	6a	6b	6c	6d
signo	a	a	α	α
(1)	99	98	56	81
(2)	93	94	99	98

Tabla 2. b)

tétrada 7	7a	7b	7c	7d
signo	a	a	α	α
(1)	63	97	102	52
(2)	103	97	97	154

Tabla 2. c)

tétrada 8	8a	8b	8c	8d
signo	a	a	α	α
(1)	53	98	58	100
(2)	109	99	100	76

Tabla 2. d)

tétrada 9	9a	9b	9c	9d
signo	a	a	α	α
(1)	54	101	101	49
(2)	126	95	97	133

Tabla 2. e)

tétrada 10	10a	10b	10c	10d
signo	a	a	α	α
(1)	49	96	100	56
(2)	104	95	78	107

5 Tabla 2. f)

tétrada 11	11a	11b	11c	11d
signo	a	a	α	α
(1)	52	99	52	96
(2)	146	88	125	99

En negrilla figuran las tétradas que corresponden a los criterios de selección aplicados a los segregantes: producción de alcohol superior o igual a 90% para la fila (1) y superior o igual a 75% para la fila (2).

2. Crecimiento y selección de híbridos

- 10 Entre los segregantes seleccionados, los segregantes de signo α se cruzan con los de signo a, para obtener los híbridos.

Los híbridos a continuación son seleccionados basándose en los siguientes criterios:

- estabilidad: la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 97% la de la población R0, y
 - rendimiento: la producción de alcohol de la población R0 es superior o igual a 95% la de la población R0 de la cepa I-4072.
- 15

Las tablas 3 y 4 indican los resultados obtenidos con los híbridos correspondientes a las cepas según la invención.

- cepas I-4073 y I-4074: híbridos procedentes del cruce del segregante 1d con el segregante 7b, y
- cepa I-4075: híbrido procedente del cruce del segregante 1d con el segregante 5a.

Los resultados obtenidos con la cepa I-4072 también están indicados.

Las tablas 3. a) y 3. b) indican los resultados obtenidos en el ensayo de fermentación alcohólica por medición del etanol producido, respectivamente a las 48 h y 72 h.

5 La fila (1) indica la producción de alcohol de la población R0 de la cepa expresada en porcentaje de la de la población R0 de la cepa I-4072, e indica por lo tanto el rendimiento de la cepa.

La fila (2) indica la producción de alcohol de la población R12 de la cepa, expresada en porcentaje de la de la población R0 de dicha cepa y por lo tanto indica la estabilidad de la cepa.

Los valores dados en las tablas corresponden a la media obtenida en al menos tres ensayos.

Tabla 3. a)

Cepa	(1)	(2)
I-4072	100,0	48,9
I-4073	99,9	99,1
I-4074	100,7	98,5
I-4075	99,8	97,8

10 Tabla 3. b)

Cepa	(1)	(2)
I-4072	100,0	46,9
I-4073	99,7	98,3
I-4074	99,1	99,2
I-4075	99,9	99,0

Los híbridos seleccionados son muy eficaces en términos de producción de alcohol puesto que la cantidad de alcohol producido es superior a 99% del obtenido con la cepa de referencia I-4072 (tabla 3. a) y 3. b)).

15 Los híbridos muestran también una estabilidad muy fuerte: la producción de alcohol entre la población R0 y R12 ha disminuido menos de 3% para los híbridos I-4073, I-4074 y I-4075.

En comparación, la producción de alcohol de la cepa I-4072 ha disminuido en más de 50% (tabla 3. a) y 3. b)).

Como recordatorio, los resultados de la población R12 corresponden a una levadura que se ha multiplicado aproximadamente 60 generaciones, lo que es superior o igual al número de generaciones medio obtenido después de una multiplicación industrial de levaduras.

20 **Ejemplo 2: Características de las levaduras según la invención**

Material y métodos

1. Producción a escala piloto

25 Las cepas de levaduras I-4073, I-4074 y I-4075 se multiplican en fermentadores de 20 litros, en modo semicontinuo, como se describe en el libro de referencia "Yeast Technology", 2ª edición, 1991, G. Reed y TW Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

A continuación se ensayan las levaduras obtenidas a partir de cada cepa en términos de estabilidad, rendimiento y rendimiento de biomasa.

La evaluación de la estabilidad de las levaduras se lleva a cabo según el ensayo de evaluación de estabilidad usado para las cepas de levaduras, de 12 subcultivos sucesivos diarios.

30 El rendimiento se evalúa midiendo la cantidad máxima de alcohol producido.

El rendimiento de biomasa se obtiene calculando la masa de levadura producida respecto a la masa de azúcar usada durante la multiplicación de las levaduras.

2. Producción industrial

La cepa de levadura I-4074 se multiplica a escala industrial.

35 La evaluación de la estabilidad de las levaduras obtenidas después de las multiplicaciones a escala industrial se

lleva a cabo según el ensayo de evaluación de estabilidad usado para las cepas de levaduras, de 12 subcultivos sucesivos diarios.

El rendimiento se evalúa midiendo la cantidad máxima de alcohol producido.

Resultados

- 5 Los resultados obtenidos después de las multiplicaciones de las cepas de levaduras a escala piloto muestran que las levaduras procedentes de cada una de las tres cepas de levaduras I-4073, I-4074 y I-4075 son estables, por lo tanto, de calidad fiable, eficaces en términos de cantidad de alcohol producido, y tienen un buen rendimiento de biomasa.
- 10 Además, después de la multiplicación industrial, las levaduras obtenidas a partir de la cepa de levadura I-4074 son estables, por lo tanto de calidad fiable. Además, estas levaduras son también eficaces en términos de cantidad de alcohol producido y tienen un buen rendimiento de biomasa.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* estable seleccionada entre la cepa depositada en la CNCM con el número I-4073, la cepa depositada en la CNCM con el número I-4074 o la cepa depositada en la CNCM con el número I-4075.
2. Procedimiento que comprende las etapas de:
 - 5 - cruce de una cepa de *Saccharomyces* inestable con ella misma o con otra cepa de *Saccharomyces*, para obtener al menos un híbrido,
 - cultivo de al menos un híbrido, para obtener una población de levaduras R0,
 - realización de n subcultivos sucesivos de la población de levaduras R0, siendo n un número entero superior o igual a 6, para obtener una población de levaduras Rn,
 - 10 - medición de la producción de alcohol de dicha población R0 y la de la producción de alcohol de dicha población Rn,
 - selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 95% la de la población R0, para obtener cepas de levaduras estables, o
 - 15 - La cepa de levadura estable es una cepa de levadura que da levaduras cuya producción de alcohol es estable a lo largo de generaciones; y
 - la cepa de levadura inestable es una cepa de levadura que da levaduras cuya producción de alcohol no es estable a lo largo de generaciones.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, que comprende una etapa complementaria de selección de al menos un híbrido para el que la producción de alcohol de la población R0 es superior o igual a 95% la de una población R0 de la cepa I-4072.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, que comprende una etapa complementaria de selección de al menos un híbrido que tiene un rendimiento de biomasa superior o igual a 90% del rendimiento de la biomasa de la cepa I-4072.
5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la etapa de cruce comprende las siguientes etapas:
 - 25 - esporulación de dicha cepa de *Saccharomyces* inestable y opcionalmente de dicha otra cepa de *Saccharomyces*, para obtener segregantes,
 - cultivo de cada segregante, para obtener una población R0 para cada segregante,
 - realización de m subcultivos sucesivos de cada segregante, para obtener una población Rm de cada segregante, siendo m un número entero superior o igual a 6,
 - 30 - medición de la producción de alcohol de la población R0 y la de la producción de alcohol de la población Rm de cada segregante,
 - selección de los segregantes para los que:
 - la producción de alcohol de la población Rm es superior o igual a 70% de la de la población R0 de dicho segregante y
 - 35 - la producción de alcohol de la población R0 es igual o superior a 85% la de la una población R0 de la cepa I-4072,
 para obtener segregantes estables y eficaces, y
 - 40 - cruce de segregantes estables y eficaces procedentes de dicha cepa inestable con segregantes estables y eficaces de signo opuesto procedentes de dicha cepa inestable o de dicha otra cepa, para obtener al menos un híbrido.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 5, en el que dicha cepa de levadura inestable es la cepa I-4072.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicha otra cepa se selecciona de entre la cepa I-4071, la cepa I-4073, la cepa I-4074 o la cepa I-4075.

8. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* derivada de una cepa según la reivindicación 1, caracterizada por que:
- la producción de alcohol de una población Rn de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0 de dicha cepa derivada, y/o
 - la producción de alcohol de una población R0 de dicha cepa derivada es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0 de la cepa depositada en la CNCM con el número I-4072,
- 5 procediendo la población Rn de n subcultivos sucesivos de la población R0, siendo n un número entero superior o igual a 6.
9. Procedimiento de evaluación de la estabilidad de una cepa de levadura, que comprende las etapas de:
- cultivo de dicha cepa, para obtener una población de levaduras R0,
 - realización de n subcultivos sucesivos de la población de levaduras R0, siendo n un número entero superior o igual a 6, para obtener una población de levaduras Rn,
 - medición de la producción de alcohol de dicha población R0 y de la producción de alcohol de dicha población Rn,
 - calificación de dicha cepa de "estable" si la producción de alcohol de la población Rn es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una población R0.
10. Levadura obtenida por cultivo de una cepa de levadura según la reivindicación 1.
11. Levadura según la reivindicación 10, caracterizada por que su producción de alcohol es superior o igual a 95% de la producción de alcohol de una levadura procedente de la cepa I-4072.
12. Levadura según la reivindicación 10 u 11, caracterizada por que está en forma de crema de levadura, levadura prensada, levadura seca o levadura congelada.
- 20 13. Uso de una levadura según una de las reivindicaciones 10 a 12, para producir alcohol.