

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 273**

51 Int. Cl.:

C12R 1/865 (2006.01)

C12G 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014 PCT/PL2014/000111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2015 WO15102500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014 E 14796564 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2914755**

54 Título: **Método para la fermentación alcohólica de mosto de miel, con alto contenido de azúcar**

30 Prioridad:

30.12.2013 PL 40671813

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**INSTYTUT BIOTECHNOLOGII PRZEMYSŁU
ROLNO-SPOZYWCZEGO (100.0%)
Ul. Rakowiecka 36
02-532 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**MISIEWICZ, ANNA;
WETOSZKA, URSZULA;
SPERA, MARIA;
CIESLAK, HANNA;
TEREBIENIEC, AGATA y
KIELISZEK, MAREK**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 650 273 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la fermentación alcohólica de mosto de miel, con alto contenido de azúcar

5 El objeto de la invención es un método para llevar a cabo la fermentación alcohólica de mosto de miel, con alto contenido de azúcar, con el uso de una cepa adecuada de levadura y preparación de levadura seca que garantice una alta capacidad de supervivencia y retención de las propiedades del proceso. La invención pertenece al campo de la biotecnología de bebidas alcohólicas, y en particular hidromiel.

10 El hidromiel es una bebida alcohólica similar al vino obtenida a través del proceso de fermentación alcohólica de miel diluida con agua, el denominado mosto de miel.

15 La producción de hidromieles no es diferente de la fabricación de vinos de frutas con la excepción del uso del material de partida básico, que no es fruta sino miel natural. La producción de hidromieles incluye: preparar el mosto de miel, cocinar y condimentar el mosto y fermentar y madurar un hidromiel joven. Los hidromieles pueden clasificarse según la manera de preparar el mosto, el grado en el que el mosto se diluye con agua y la forma de condimentar el mosto.

20 La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura superior típica usada en la producción de vino. Se caracteriza por una alta producción de compuestos aromáticos durante la fermentación y son resistentes a la temperatura y según el tipo se propagan a temperaturas de desde 8 hasta 15°C, desde 15 hasta 25°C y desde 15 hasta 35°C. La levadura se usa en la producción de vinos tintos y blancos. Su inconveniente es la sensibilidad a altas concentraciones de alcohol y azúcar así como una alta demanda de nitrógeno. Para la fermentación de mostos con un alto contenido de azúcar, a menudo se usan levaduras de la especie *Saccharomyces bayanus*. Esta levadura
25 se atenúa habitualmente de manera rápida, es resistente a altas concentraciones de alcohol y azúcar, tiene requisitos relativamente pequeños en cuanto a nitrógeno y es resistente a bajas temperaturas. Sin embargo, el vino obtenido tiene poco aroma y un contenido de SO₂ aumentado.

30 La levadura usada para la producción de hidromieles aparte de las propiedades requeridas para las levaduras de vinos, es decir fermentación preliminar y fermentación, alto grado de fermentación real de azúcares, tiempo de generación corto, debe ser adicionalmente resistente a una alta presión osmótica provocada por alto extracto primario y debe presentar resistencia a ácido fórmico que se produce con la fermentación de hidromieles de mosto sin hervir.

35 La capacidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de crecer y fermentar en mostos osmófilos, es decir aquellos con una alta concentración de sustratos depende de la concentración de hidratos de carbono intercelulares: trehalosa y glicógeno.

40 Junto con el aumento de presión osmótica en el entorno, por ejemplo mostos concentrados con una densidad de entre 25 y 30^o Balling, algunas cepas de levadura presentan un aumento de la síntesis de trehalosa de desde el 0,1% hasta el 8% e incluso hasta el 12% en masa seca, lo que garantiza un crecimiento celular intensivo y aumenta la eficacia de la biomasa a partir del azúcar. Desgraciadamente, las propiedades osmófilas de las levaduras adquiridas debido a un aumento del contenido en trehalosa intracelular disminuyen gradualmente con el tiempo de almacenamiento.

45 La fermentación de mezclas y mostos con altos extractos y en particular hidromieles de Dwójniak y Trojniak es difícil debido a la alta concentración de azúcares en el mosto y a la alta presión osmótica asociada. Durante la fermentación de entornos altamente concentrados a menudo no se logra el contenido de alcohol deseado y la acidez volátil aumenta desfavorablemente. En particular, esto está asociado con la alta presión osmótica de las disoluciones, los efectos tóxicos de alcohol y otros productos del metabolismo de levaduras.
50

La eficacia del proceso en todos los procesos biotecnológicos depende de la cantidad y la calidad de los microorganismos usados. En este sentido, además de tener en cuenta la reducción máxima de operaciones auxiliares, cada vez con más frecuencia, en lugar de cultivos iniciadores puros, se distribuyen preparaciones de microorganismos adecuadas y se usan directamente en la producción. Debido a la necesidad de transporte, y para garantizar la vida útil de almacenamiento, vienen en forma seca y se describen como secados o instantáneos.
55

El agua en las células de levadura actúa como una enzima, sustancia nutritiva y disolvente de coloides. Secar los microorganismos hace que se elimine de un entorno en el que tienen lugar reacciones bioquímicas. Como resultado de la deshidratación, se producen cambios estructurales en el biopolímero, paredes celulares, órganos y células completas. Estos procesos cambian la resistencia de los microorganismos a factores externos tales como pH, temperatura, presión y viscosidad. El microorganismo puede morir como resultado de daño a la membrana celular, desnaturalización térmica de proteínas, desestabilización del transporte de sustancias disueltas en agua debido a un aumento en la viscosidad ambiental. La resistencia fisiológica de los microorganismos durante el proceso de secado está asociada con procesos adaptativos, la resistencia física asociada con la estructura del microorganismo particular. Hay un contenido de humedad crítico, y si se supera, provoca inactividad deshidratante de los
60
65

microorganismos y su progreso depende de la humedad de la biomasa. La eliminación de agua durante el proceso de secado provoca que las proteínas protoplasmáticas se transformen de hidrosol a hidrogel. Esta transformación se produce junto con la extracción de agua para una célula y conduce a una detención temporal, pero reversible de las funciones vitales del sistema - anabiosis hasta un grado dependiente de la cantidad de agua restante.

5 El objetivo de los estudios de Mendes-Ferreira A *et al.* (2010) era optimizar la producción de hidromiel mediante el uso de una formulación de mosto de miel adecuada para mejorar el rendimiento de las levaduras en la fermentación alcohólica y así obtener un producto de alta calidad. Se centrifugó el mosto de miel para reducir sólidos insolubles, se pasteurizó a 65°C durante 10 min, y luego se sometió a condiciones diferentes: complementación de nitrógeno y adición de ácidos orgánicos. Aunque la adición de fosfato de diamonio (DAP) redujo la duración de la fermentación, no garantizó la integridad del proceso de fermentación, lo que sugiere que otros factores podrían justificar la reducción en la actividad de la levadura en fermentaciones de mosto de miel. Los resultados sugirieron que la reducción en la capacidad de fermentación de la levadura, y por tanto el aumento en el riesgo de fermentaciones retrasadas o detenidas, se debe a factores distintos de limitación de nitrógeno en mostos de miel (Mendes-Ferreira A *et al.* Optimization of honey-must preparation and alcohol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. Int J Food Microbiol. 15 de noviembre de 2010; 144(1):193-8).

20 Los principales objetivos de la investigación de Pereira AP *et al.* (2009) fueron evaluar la capacidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de miel de Tras-os-Montes (noreste de Portugal), para producir hidromiel. Se evaluaron cinco cepas de miel, una cepa de laboratorio y una cepa comercial de vino, para determinar su rendimiento de fermentación con etanol, dióxido de azufre y estrés osmótico. Todas las cepas mostraron un comportamiento similar en estas condiciones. Dos cepas de levadura aisladas de miel y la cepa comercial de vino se sometieron a prueba adicionalmente para determinar la producción de hidromiel, usando dos mieles diferentes (una miel oscura y una clara), enriquecidas con dos complementos (uno comercial y uno desarrollado por el equipo de investigación), como medios de fermentación. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que cepas de *S. cerevisiae* aisladas de miel, son adecuadas para la producción de hidromiel. Sin embargo, es de extrema importancia tener en cuenta las características de la miel, y los complementos usados en la formulación del medio de fermentación, con el fin de lograr los mejores resultados en la producción de hidromiel (Pereira AP *et al.* Mead production: selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. Food Chem Toxicol. Agosto de 2009; 47(8): 2057-63).

35 Pereira AP *et al.* (2013) presentaron una investigación sobre la optimización de la fermentación de hidromiel. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la cepa de levadura y el tamaño del inóculo pueden tener un impacto favorable en los perfiles de sabor y aroma del hidromiel. (Pereira AP *et al.* High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. Food Microbiol. Febrero de 2013; 33(1):114-23).

40 Al evaluar la calidad de levadura de vino seca o levadura de hidromiel seca, aparte de la capacidad de fermentación de la levadura también se tiene en cuenta su pureza microbiológica y el número de células muertas. La levadura superior puede infectarse con otros microorganismos, entre otros: levadura silvestre, bacterias fermentativas, mohos, etc. Una cantidad en exceso de otra microflora puede provocar un deterioro de las propiedades organolépticas y disminuir la vida útil de almacenamiento del vino. Mientras que con un número excesivo de células muertas de levadura su actividad de fermentación puede reducirse. La levadura de hidromiel puede suministrarse solamente en medio de agar o en forma de un cultivo iniciador líquido, excluyendo ambas formas el almacenamiento durante más de unas pocas semanas sujeto a almacenarse en un almacén frío, y requiriendo que el cultivo iniciador se propague durante algunos días. El uso de un cultivo iniciador en forma de levadura seca garantiza una fermentación adecuada y permite lograr un producto con las propiedades fisicoquímicas y sensoriales requeridas. En el caso de usar mostos no estériles (sin hervir, donde los componentes nutricionales valiosos no se destruyen durante la ebullición) las preparaciones secas eliminan el riesgo de contaminación de microflora no deseada, lo que es particularmente importante para la producción a gran escala.

50 Por tanto, el objetivo de la invención es desarrollar un método para la fermentación alcohólica de mosto de miel con alto contenido de azúcar con el uso de una cepa de levadura adecuada así como la administración de una preparación de levadura seca que garantiza una vida útil de almacenamiento adecuada y la retención de las propiedades del proceso, permitiendo el uso de las preparaciones obtenidas en un proceso de fermentación eficaz, con una activación de las funciones del metabolismo casi instantánea, tanto inmediatamente después de obtener la preparación así como después de unos pocos meses de almacenamiento.

60 El objeto de la invención es un método de fermentación alcohólica de mosto de miel con alto contenido de azúcar tal que la cepa Scm de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección IAFB de Microorganismos Industriales con el número KKP 2052 p se introduce en la mezcla de mosto de miel y se lleva a cabo la fermentación del mosto, preferiblemente durante 30 días, hasta que se obtiene un hidromiel joven.

Preferiblemente, la mezcla contiene más de 20° Balling de extracto real.

65 Preferiblemente, se introduce una cepa Scm secada de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la mezcla de mosto.

Preferiblemente, el contenido de masa seca en la preparación de la cepa Scm de *Saccharomyces cerevisiae* seca es del 92-94%.

5 Preferiblemente, la preparación seca de la cepa Scm de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtiene mediante su aplicación a salvado de trigo y posterior secado.

10 Preferiblemente, se combina la levadura (Scm) *Saccharomyces cerevisiae* con densidad de $10^6/1$ ml entre el 40% y el 50% en volumen con el salvado en una razón en peso de 1:10, y la masa obtenida se somete a un proceso de secado durante el cual se evapora agua a una temperatura de entre 20°C y 40°C hasta que se obtiene un contenido en agua de no menos del 10%.

15 Otro objeto de la invención es una bebida de hidromiel obtenida como resultado de la fermentación alcohólica de mosto de miel con alto contenido de azúcar realizada según el método definido. Otro objeto de la invención es el uso de la cepa de levadura (Scm) de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección IAFB de Microorganismos Industriales con el número KKP 2052 p para la producción de hidromiel.

Preferiblemente, la cepa de levadura (Scm) de *Saccharomyces cerevisiae* se usa como preparación seca.

20 Otro objeto de la invención es la cepa Scm de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección IAFB de Microorganismos Industriales con el número KKP 2052 p.

Figura 1. Concentraciones de azúcares y alcohol etílico después de a) 60 y b) 91 días de fermentación de mosto de miel con diferentes densidades. Cepa Scm de levadura de hidromiel. Determinado usando HPLC.

25 Figura 2. Pérdida de CO₂ durante la fermentación de mostos de miel con diferentes concentraciones de azúcar primarias (N - fermentación con adición de fuente de nitrógeno).

30 Figura 3. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de levadura seca almacenada durante 2 meses.

Figura 4. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de levadura seca almacenada durante 4 meses.

35 Figura 5. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de levadura seca almacenada durante 6 meses.

Figura 6. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de levadura seca almacenada durante 8 meses.

40 Figura 7. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de una cepa de levadura Sct secada en salvado después de diversos tiempos de almacenamiento.

45 Figura 8. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de una cepa de levadura Sct secada en orujo de manzana después de diversos tiempos de almacenamiento.

Figura 9. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de una cepa de levadura Scm secada en salvado después de diversos tiempos de almacenamiento.

50 Figura 10. Cromatogramas de muestras de hidromiel obtenidas después de la fermentación con el uso de una cepa de levadura Scm secada en orujo de manzana después de diversos periodos de almacenamiento.

55 Figura 11. Contenido de glucosa y fructosa en hidromieles después de 30 días de fermentación de mosto de miel con una densidad primaria de 28^º Balling. Se usaron preparaciones de levadura de hidromiel Scm y Sct secadas en salvado u orujo como inóculo después de diferentes periodos de almacenamiento.

60 Figura 12. Contenido de etanol en hidromieles después de 30 días de fermentación de mosto de miel con una densidad primaria de 28^º Balling. Se usaron preparaciones de levadura que producen hidromiel Scm y Sct secadas en salvado u orujo como inóculo después de diferentes periodos de almacenamiento. Se obtuvieron los resultados usando el método de HPLC.

Figura 13. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación de mosto de miel con una densidad primaria de 28^º Balling. Se usó levadura tomada directamente de cultivos inclinados como inóculo. Se obtuvieron los resultados usando HPLC.

65 Figura 14. Comparación de parámetros de vino joven e hidromiel joven (concentraciones de azúcares particulares y alcohol etílico) determinados con el uso de HPLC tras 30 días de fermentación. Se usó levadura de vino o hidromiel

tomada directamente de cultivos inclinados como inóculo.

Figura 15. Secuencia de nucleótidos de ITS1, gen de ARNr 5.85 y región ITS2 de la cepa Scm de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Figura 16. Comparación de la secuencia de nucleótidos de ITS1, gen de ARNr 5.85 y región ITS2 de la cepa Scm de *Saccharomyces cerevisiae* con secuencias depositadas en NCBI.

10 Figura 17. Secuencia de nucleótidos del gen ITS1 de ARNr 18S parcial, gen de ARNr 5.85 e ITS2 y gen de ARNr 26S parcial del conjunto de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 18. Comparación de secuencia de nucleótidos del gen ITS1 de ARNr 18S parcial, gen de ARNr 5.85 e ITS2 y gen de ARNr 26S parcial del conjunto de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con secuencias depositadas en NCBI.

15 **Ejemplo**

Obtención de preparación de levaduras

20 Se propagó el inóculo con el uso de *Saccharomyces cerevisiae* (Scm). Se llevó a cabo la propagación de la biomasa de levadura en condiciones estacionarias en matraces aireados o en fermentador, que tenían una capacidad de hasta 5 dm³ con aeración de 1 vol./vol. y rotación a 800÷900 rpm. Una vez se completó el cultivo, la levadura se centrifugó, se aclaró varias veces con agua estéril, se mezcló con medio estéril de salvado de levadura u orujo de manzana y se secó. Se llevó a cabo la preparación para el proceso de secado combinando 10⁶ /1 ml de densidad levadura con entre el 40% y el 50% de salvado en volumen en una razón en peso de 1:10. La masa obtenida se somete a un proceso de secado durante el cual se evapora agua a temperaturas de entre 20°C y 40°C hasta que se obtiene un contenido en agua de no menos del 10%. Se almacenaron preparaciones de levadura secada a temperatura ambiente durante periodos de entre unos pocos a una docena o más de meses.

30 Pruebas de fermentación

Se llevaron a cabo las pruebas de fermentación en matraces de fondo plano de 500 ml cerrados con tubos de fermentación que contenían 250 ml de mosto de manzana o mosto de miel según el tipo de levadura usado.

35 Se añadió levadura de hidromiel seca a los matraces. Además, se llevaron a cabo fermentaciones usando levadura recogida de cultivo inclinado e inóculo líquido, estos se trataron como fermentaciones de control. Se llevaron a cabo fermentaciones a una temperatura adecuada para las necesidades de la levadura. Tras la finalización de la fermentación, se separó la levadura centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos. Las pruebas de actividad de cultivos de levadura de vino conllevaron determinar la energía de fermentación y las características de vino joven (azúcar, contenido de alcohol). Se determinó la energía de fermentación de cepas de levadura analizadas basándose en el CO₂ producido durante la fermentación.

40 Fermentaciones de hidromiel a diferentes niveles de azúcar

45 Se llevaron a cabo fermentaciones de hidromiel a diferentes niveles de azúcar. Se usó la cepa Scm de levadura de hidromiel como inóculo. Se recogió la levadura directamente del cultivo inclinado, se llevó a cabo fermentación a 20±2°C. Debido a diferentes densidades del mosto, se realizó fermentación durante un periodo de más de 30 días, algunas de las fermentaciones se detuvieron después de 39 días y otras después de 60 días. Se muestra la reducción de CO₂ durante la fermentación en la tabla 1. Las tablas posteriores muestran resultados de análisis de "hidromiel joven" obtenidos usando métodos y cromatografía convencionales.

50 Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de "hidromiel joven" después de 39 y 60 días de fermentación con uso de levadura de hidromiel, según las concentraciones de mosto primarias.

Parámetro	Tiempo [días]	Densidad de mosto primaria [° Balling]				
		28	35	40	45	50
Alcohol – después de 39 días [% en vol.]	39	3,0	6,6	4,2	3,0	2,0
	60	5,2	7,0	5,2	3,4	2,0
Extracto aparente [° Balling]	39	22,5	27,0	35,3	43,0	48,5
	60	20,0	23,0	35,0	42,0	48,0
Extracto real [g/100 ml]	39	23,5	28,0	32,3	40,0	43,0
	60	22,0	25,7	36,5	43,4	49,5

Azúcares como sacarosa [%]	60	24,45	28,21	49,76	63,61	66,69
Acidez [g de ácido málico/l]		2,91	3,52	4,25	3,88	3,45

5 Cuanto mayor fue la concentración de mosto, más tarde se observó la primera pérdida de CO₂ en las muestras. Según aumentaba la concentración de mosto, las pérdidas de CO₂ totales después de 39, 60 y 90 días fueron menores. Para mostos de 40, 45 y 50° Balling después del día 40 la pérdida de masa fue mínima. En mostos de 28 y 35° Balling, se observaron cambios de masa en las muestras provocados por una pérdida de CO₂ incluso hasta el día 90. Se obtuvo la mayor parte de alcohol etílico después de 90 días de fermentación en mostos con una densidad primaria de 35° Balling - aproximadamente el 7%. En mostos con una densidad primaria de 28° Balling y 40° Balling después de 90 días se obtuvo el 5% de etanol. En un mosto de 28° Balling, habría sido posible atenuar los azúcares restantes y obtener mayores concentraciones de etanol, sin embargo, la temperatura de fermentación (20°C) fue demasiado baja.

10 Tabla 2. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usaron células de levadura de hidromiel de *Saccharomyces cerevisiae* (Scm) como inóculo tomadas directamente del cultivo inclinado.

Parámetro	Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Scm)
Concentración de alcohol [% en vol.]	12,3
Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	9,96
Acidez global [g de ácido málico/l]	3,62
Extracto total [g/l]	151,06

15 Se propagó la levadura de hidromiel Scm en condiciones estacionarias y se obtuvieron 37 g/l así como en un fermentador y diferentes mostos: mosto de miel con una densidad de 28° Balling y mosto basado en concentrado de manzana con una densidad de 21° Balling. La figura 1 muestra resultados de HPLC.

20 Tabla 3. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usaron células de levadura de hidromiel Sct o Scm como inóculo tomadas directamente del cultivo inclinado.

Parámetro	Cepa	
	Sct	Scm
Concentración de alcohol [% en vol.]	11,3	12,3
Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	13,56	9,96
Acidez global [g de ácido málico/l]	3,62	3,62
Extracto total [g/l]	196,84	151,06

25 Tabla 4. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usó levadura de hidromiel seca Sct o Scm directamente después de su preparación como inóculo

Parámetro	Sct		Scm	
	Orujo	Salvado	Orujo	Salvado
Concentración de alcohol [% en vol.]	10,3	12,2	14,7	14,3
Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	10,14	10,6	7,46	7,6
Acidez global [g de ácido málico/l]	3,75	3,69	3,89	4,19
Extracto total [g/l]	161,12	149,92	127,77	117,92

30 Tabla 5. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usó levadura de hidromiel Sct o Scm almacenada durante 2 meses a temperatura ambiente como inóculo.

Parámetro	Sct		Scm	
	Orujo	Salvado	Orujo	Salvado
Concentración de alcohol [% en vol.]	12,3	11,0	13,7	11,7

Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	9,98	13,44	10,17	10,23
Acidez global [g de ácido málico/l]	3,58	3,33	3,43	3,54
Extracto total [g/l]	141,04	170,16	131,43	142,89

Tabla 6. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usó levadura de hidromiel Sct o Scm almacenada durante 4 meses a temperatura ambiente como inóculo.

Parámetro	Sct		Scm	
	Orujo	Salvado	Orujo	Salvado
Concentración de alcohol [% en vol.]	6,1	7,0	6,5	9,1
Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	22,6	27,0	23,1	18,8
Acidez global [g de ácido málico/l]	3,45	3,15	3,25	3,43
Extracto total [g/l]	-	242,76	248,6	206,8
% de masa seca	18,04	9,93	17,86	20,16

5 Tabla 7. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usó levadura que produce hidromiel Sct o Scm almacenada durante 6 meses a temperatura ambiente como inóculo.

Parámetro	Sct		Scm	
	Orujo	Salvado	Orujo	Salvado
Concentración de alcohol [% en vol.]	-	5,07	7,34	9,87
Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	-	-	-	-
Acidez global [g de ácido málico/l]	1,27	3,07	3,31	3,43
Extracto total [g/l]	311,65	272,24	236,22	190,69
% de masa seca	17,44	17,80	19,04	23,33

10 Tabla 8. Parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usó levadura de hidromiel Sct o Scm almacenada durante 8 meses a temperatura ambiente como inóculo.

Parámetro	Sct		Scm	
	Orujo	Salvado	Orujo	Salvado
Concentración de alcohol [% en vol.]	4,4	11,9	11,8	9,5
Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	12,99	11,24	12,03	15,67
Acidez global [g de ácido málico/l]	2,70	3,21	3,26	3,14
Extracto total [g/l]	257,72	135,48	136,58	169,02

15 Una vez se detuvo la fermentación, se obtuvieron concentraciones de alcohol ligeramente más altas y menores concentraciones de extracto y azúcar con el uso de la cepa Scm de levadura, las diferencias son más pronunciadas para levadura del cultivo inclinado y preparaciones usadas inmediatamente después de su preparación así como preparaciones almacenadas durante 2 meses.

20 Análisis de diferencias en concentraciones de etanol entre muestras dadas y diferencias en las concentraciones de glucosa y fructosa.

En la tabla 9 y en las figuras 11 y 12, las concentraciones de glucosa, fructosa y etanol se representan obtenidas durante el análisis de muestras de HPLC.

25 Tabla 9. Contenido de glucosa, fructosa y etanol en hidromieles después de 30 días de fermentación. Se usaron diversas levaduras de hidromiel tras diferentes periodos de almacenamiento como inóculo. Determinado usando HPLC.

ES 2 650 273 T3

Fructosa [g/l]	Sct/b	Sct/p	Scm/b	Scm/p
2 meses	86,186	39,177	36,617	25,260
después de 4 meses	105,716	123,661	92,717	120,225
después de 6 meses	143,897	185,248	97,482	114,522
después de 8 meses	35,909	107,588	65,895	36,476
Glucosa [g/l]	Sct/b	Sct/p	Scm/b	Scm/p
2 meses	52,519	70,262	74,055	78,387
después de 4 meses	34,419	24,345	46,079	26,562
después de 6 meses	19,074		45,889	31,763
después de 8 meses	70,806	29,153	58,193	68,494
Etanol [% en vol.]	Sct/b	Sct/p	Sct/b	Sct/p
después de 2 meses	11,751	16,209	16,590	18,097
después de 4 meses	10,393	8,689	12,043	8,861
después de 6 meses	7,709	0,000	12,216	11,088
después de 8 meses	15,897	9,914	12,611	16,466

- 5 Durante la fermentación con el uso de levadura almacenada durante 2 meses, se obtuvo la mayor parte del etanol usando fermentación con el uso de la cepa Scm secada en orujo de manzana. Se obtuvo una cantidad similar de alcohol durante la fermentación con el uso de la cepa Scm secada en salvado y Sct secada en orujo. Se obtuvo la menor parte de etanol en hidromiel inoculado con levadura Sct en salvado. En fermentaciones con levadura después de 4 meses de almacenamiento, la mayor parte del etanol aparecía en una muestra inoculada con levadura Scm en salvado, ligeramente menos en una muestra inoculada con levadura Sct en salvado, y la menor parte (aproximadamente el 8%) en muestras basadas en levaduras Sct y Scm en orujo. En muestras en las que se obtuvo menos etanol, se atenuaron la glucosa y fructosa en un menor grado. En muestras con levadura después de 6 meses de almacenamiento, se obtuvo la mayor parte del etanol en la muestra basada en cepa Scm secada en salvado (12%), se obtuvo ligeramente menos (11%) en la muestra de Scm secada en orujo, se obtuvo aproximadamente el 7,7% de alcohol después de la fermentación con la cepa Sct secada en salvado. Después de 8 meses de almacenamiento, se produjo la mayor parte del alcohol etílico mediante la levadura de la cepa Scm en
- 10 orujo y Sct en salvado (~16%), se halló menos etanol en la muestra fermentada con Scm en salvado (~12,5%) y la
- 15 menor parte en la muestra de Sct en orujo (~10%).

20 Durante las fermentaciones en las que se usó levadura Scm secada en salvado, se obtuvo la mayor parte del alcohol después de usar una preparación almacenada durante 2 meses, se obtuvieron cantidades de alcohol similares, aproximadamente el 12% en vol. en fermentaciones usando preparaciones almacenadas durante 4, 6 y 8 meses. Quedaron las menores partes de azúcares, glucosa y fructosa en hidromieles en los que se usó una preparación de 2 meses. Se hallaron concentraciones cada vez más altas de azúcares en hidromieles obtenidos usando preparaciones almacenadas durante 8, 6 y 4 meses respectivamente.

25 En fermentaciones en las que se usó levadura Scm secada en orujo, se obtuvo la mayor parte del alcohol etílico usando preparaciones almacenadas durante 2 meses y luego se disminuyó en vinos en los que se usaron preparaciones de 8, 6 y 4 meses (las más disminuidas). Las concentraciones de azúcar después de la fermentación aumentaron inversamente a las concentraciones de alcohol. Las menores partes de azúcares se hallaron después de usar preparaciones de 2 meses y luego aumentó para preparaciones de 8, 6 y 4 meses.

30 La figura 13 muestra parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación, análisis basados en métodos de cromatografía líquida. Se usó levadura tomada directamente de cultivo inclinados como inóculo para la fermentación. En muestras en las que se usó la levadura de cepa Scm como inóculo, se logró una atenuación de azúcares ligeramente mejor (fructosa en primer lugar seguido por glucosa) y concentraciones de etanol ligeramente mayores que en muestras en las que se usaron levaduras Sct.

5 Se determinaron las concentraciones de azúcares particulares y alcohol etílico usando HPLC en hidromiel joven después de 30 días de fermentación. Se usó levadura tomada directamente de cultivo inclinados como inóculo. La cepa Scm atenuó mejor la fructosa y produjo más alcohol etílico que la cepa Sct. Las concentraciones de glucosa después de 30 días de fermentación en las cepas Scm y Sct son similares. Los resultados de determinación de fructosa y glucosa obtenidos usando HPLC están en línea con los resultados obtenidos expresando azúcares en cuanto a la sacarosa. La figura 14 muestra una comparación de vinos e hidromieles jóvenes.

10 La concentración de alcohol etílico después de 30 días de fermentación fue similar en vinos jóvenes e hidromieles jóvenes. Las cepas Sct produjeron ligeramente menos etanol que las cepas Scm. En vinos jóvenes, se hallaron pequeñas cantidades de sorbitol (se halló sorbitol en mosto, se produjeron cantidades muy pequeñas durante la fermentación). No se halló sorbitol en mosto de miel o hidromieles después de 30 días de fermentación. Los trisacáridos hallados en hidromieles se determinaron que eran maltotriosa, en vinos basados en mosto de manzana no se halló maltotriosa después de la fermentación con la excepción de una muestra en la que se halló maltotriosa pero no sorbitol. En hidromieles después de 30 días de fermentación, se hallaron concentraciones de fructosa y concentraciones de glucosa mucho más altas, aproximadamente 1,5 veces más que altas que en vinos jóvenes. Esto se deriva principalmente del contenido y la densidad del mosto fermentado. Las cepas Scm fueron mejores que las cepas Sct en la atenuación de fructosa.

20 Fermentaciones que usan levadura propagada en un fermentador

La tabla 10 muestra parámetros de hidromiel joven después de 30 días de fermentación del mosto de miel. Se usó levadura de hidromiel propagada en un fermentador. Se usaron preparaciones directamente después de producirse.

25 Tabla 10. Parámetros de vino joven después de 30 días de fermentación. Se usó levadura de hidromiel propagada en un fermentador y secada en salvado como inóculo.

Parámetro	
Concentración de alcohol [% en vol.]	10,6
Contenido de azúcar expresado como sacarosa [%]	12,2
Acidez global [g de ácido málico/l]	3,99
Extracto total [g/100 ml]	146,57

30 La duración de la levadura que crece en el fermentador no afectó a la calidad del hidromiel. Las concentraciones de etanol, la acidez general cumplen los criterios requeridos.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

<p>A: Urszula Wetoszka,</p> <p>Departamento de Microbiología, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology</p> <p>Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Varsovia</p> <p style="text-align: center;">NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITARIO</p>	<p>RECIBO EN EL CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL</p> <p>expedido de acuerdo a la norma 7.1 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL</p> <p>identificada al final de esta página</p>
---	--

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITARIO: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Scm	Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KKP 2052p
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I anteriormente iba acompañado por:	
<input checked="" type="checkbox"/> una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una denominación taxonómica propuesta (marcar con una cruz cuando sea aplicable)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I anteriormente, que se recibió el 28/12/2013 (fecha del depósito original) ¹	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Colección de Cultivos de Microorganismos Industriales, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)
Dirección: 02-532 Varsovia Rakowicka 36	[firma ilegible] Fecha: 15/05/2014

¹ Cuando se aplica la norma 6.4(d), tal fecha es la fecha en la que se adquirió el estatus de autoridad depositaria internacional

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Departamento de Microbiología, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology
 Ul. Rakowiecka 36, 02-532 Varsovia
 NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A LA QUE SE LE REALIZA LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

expedida de acuerdo a la norma 10.2 por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

identificada en la siguiente página

<p>I. DEPOSITARIO</p> <p>1. Nombre: Urszula Wetoszka</p>	<p>II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</p> <p>Número de registro dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL KKP 2052p</p> <p>Fecha del depósito o de la transferencia¹: 28/12/2013</p>
<p>III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD</p> <p>La viabilidad del organismo identificado en II anteriormente se sometió a prueba el 12/05/2014². En esa fecha, dicho organismo era</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> inviable</p>	

¹ Indicar la fecha del depósito original o, cuando se haya realizado un nuevo depósito o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

² En los casos a los que se hace referencia en la norma 10.2(a)(ii) y (iii), consulte la prueba de viabilidad más reciente.

³ Marcar con una cruz la casilla aplicable.

IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HABÍA REALIZADO LA PRUEBA DE VIABILIDAD ⁴	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Colección de Cultivos de Microorganismos Industriales, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology	Firma(s) de la(s) persona(s) que tiene(n) el poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)
Dirección: 02-532 Varsovia Rakowicka 36	[firma ilegible] Fecha: 15/05/2014

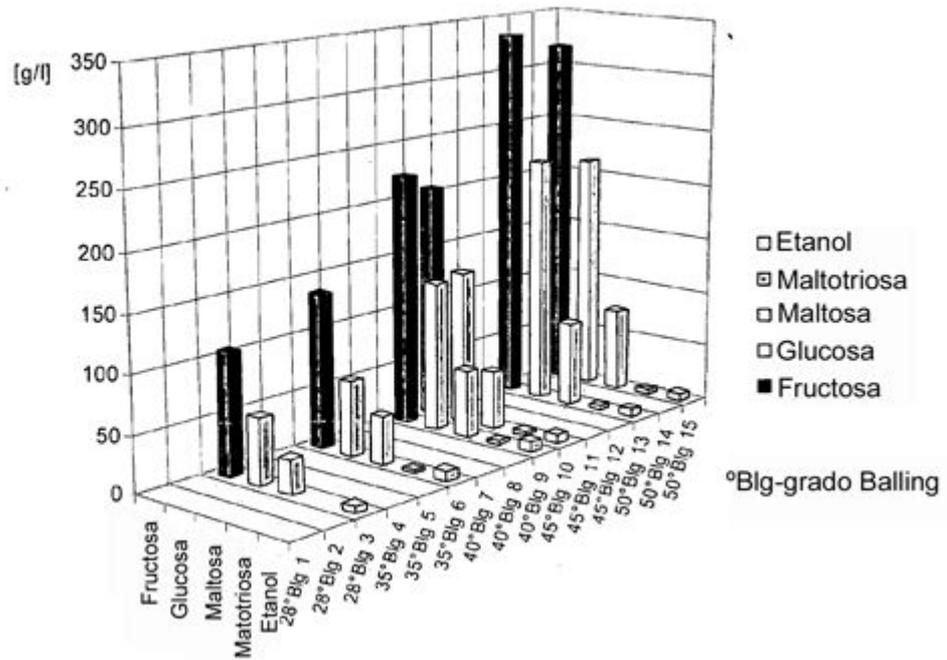
⁴ Rellenar si se ha solicitado la información y si los resultados de la prueba fueron negativos.

Formulario BP/9 (segunda y última página)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la fermentación de mosto de miel con alto contenido de azúcar, en el que se introduce la cepa Scm de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección IAFB de Microorganismos Industriales con el número KKP 2052 p en la mezcla de mosto de miel y se lleva a cabo la fermentación del mosto, preferiblemente durante 30 días, hasta que se obtiene un hidromiel joven.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla contiene más de 20º Balling de extracto real.
- 10 3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque se introduce una cepa Scm secada de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la mezcla de mosto.
4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque el contenido en masa secada en una preparación de la cepa Scm de *Saccharomyces cerevisiae* seca es del 92-94%.
- 15 5. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque la preparación seca de la cepa Scm de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtiene mediante su aplicación a salvado de trigo y posterior secado.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque se combina una levadura (Scm) de *Saccharomyces cerevisiae* con densidad de $10^6/1$ ml entre el 40% y el 50% en volumen con el salvado en una razón en peso de 1:10, y se somete la sustancia obtenida a un proceso de secado durante el cual se evapora agua a temperaturas de entre 20°C y 40°C hasta que se obtiene un contenido en agua de no más del 10%.
- 25 7. Cepa Scm de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección IAFB de Microorganismos Industriales con el número KKP 2052 p.
8. Uso de la cepa de levadura (Scm) de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección IAFB de Microorganismos Industriales con el número KKP 2052 p para la producción de hidromiel.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8, caracterizado porque la cepa de levadura (Scm) de *Saccharomyces cerevisiae* se usa como preparación seca.

a)



b)

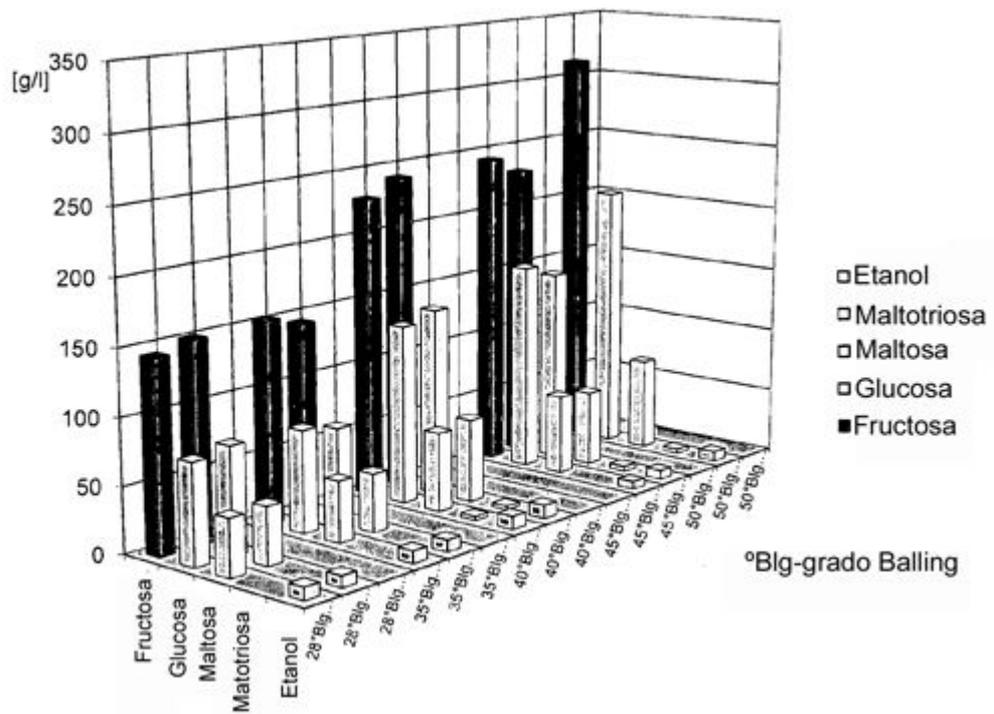


Fig. 1

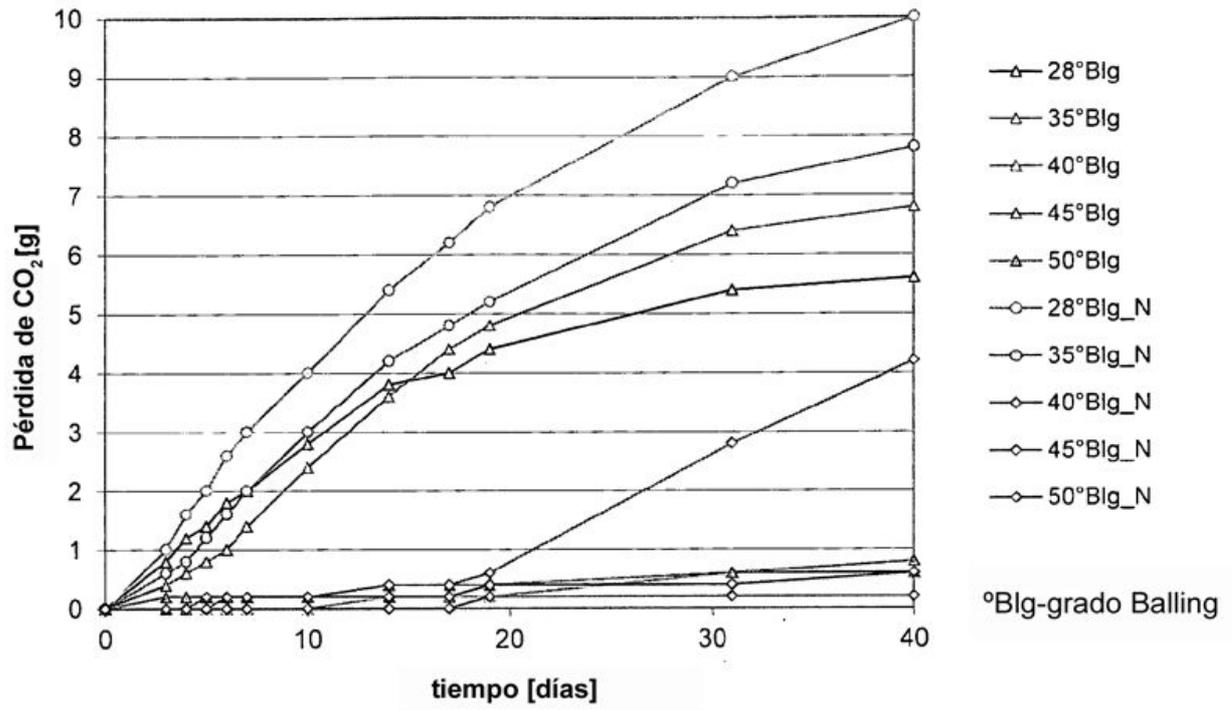


Fig. 2

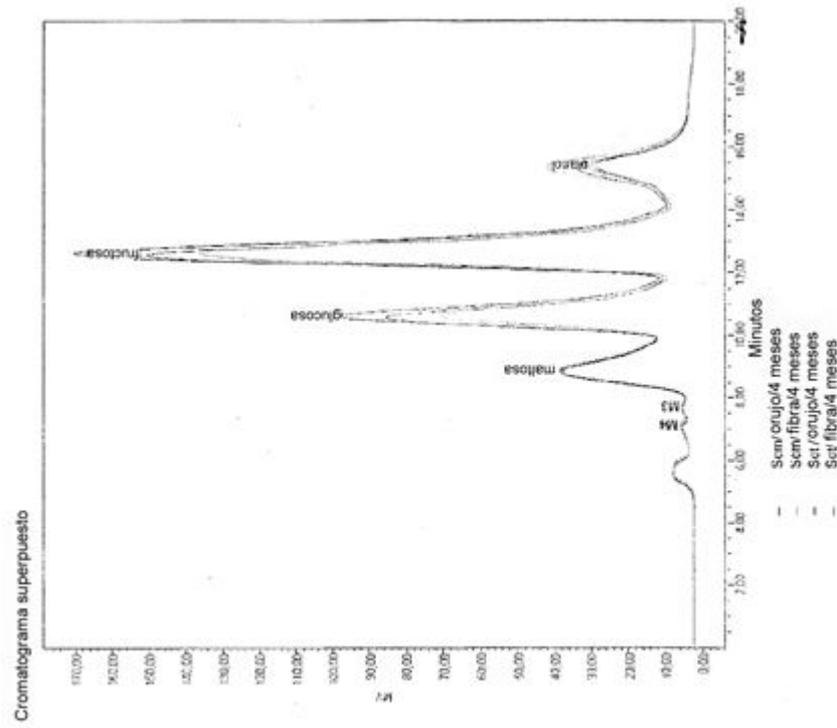


Fig. 3

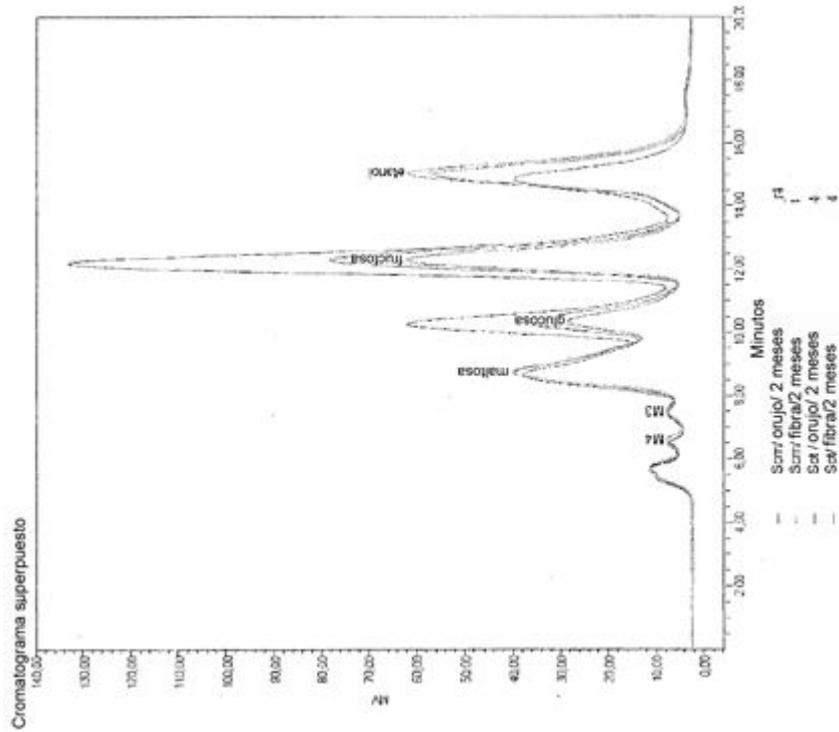


Fig. 4

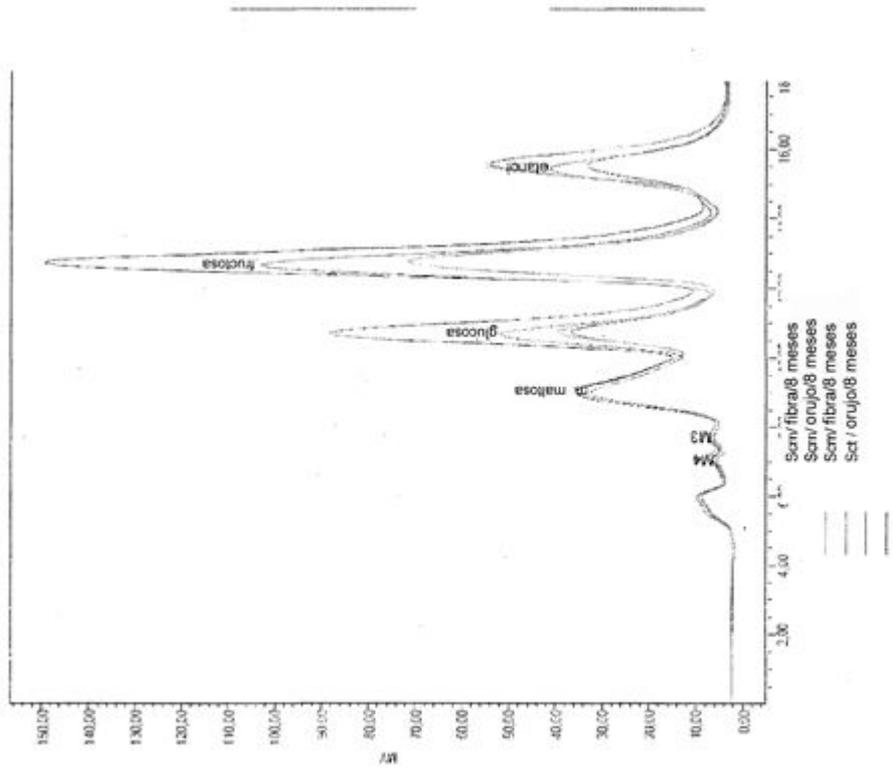


Fig. 5

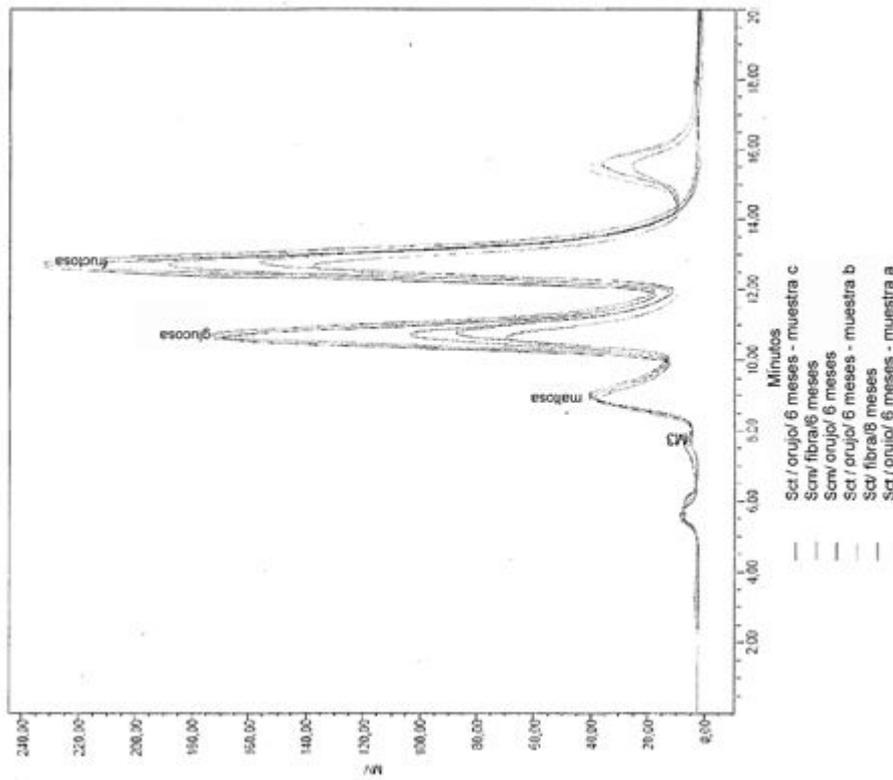


Fig. 6

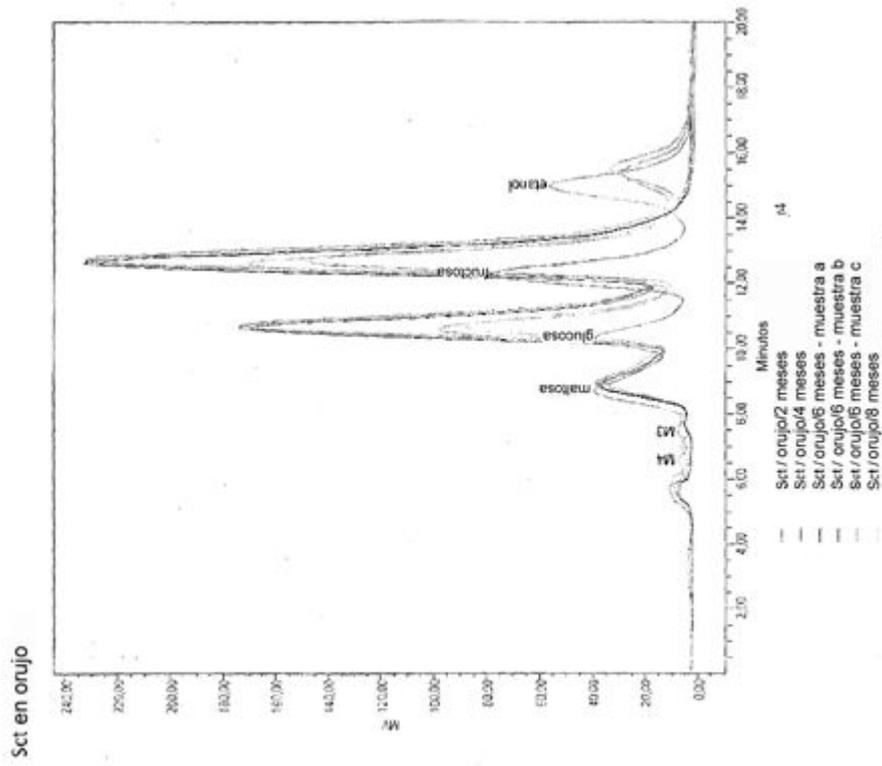


Fig. 8

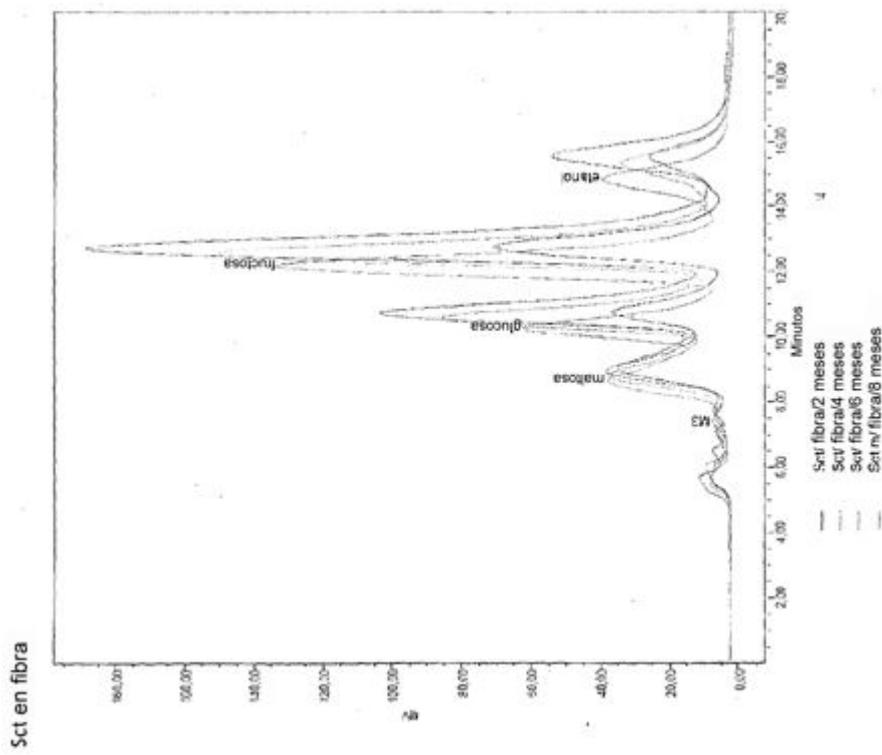


Fig. 7

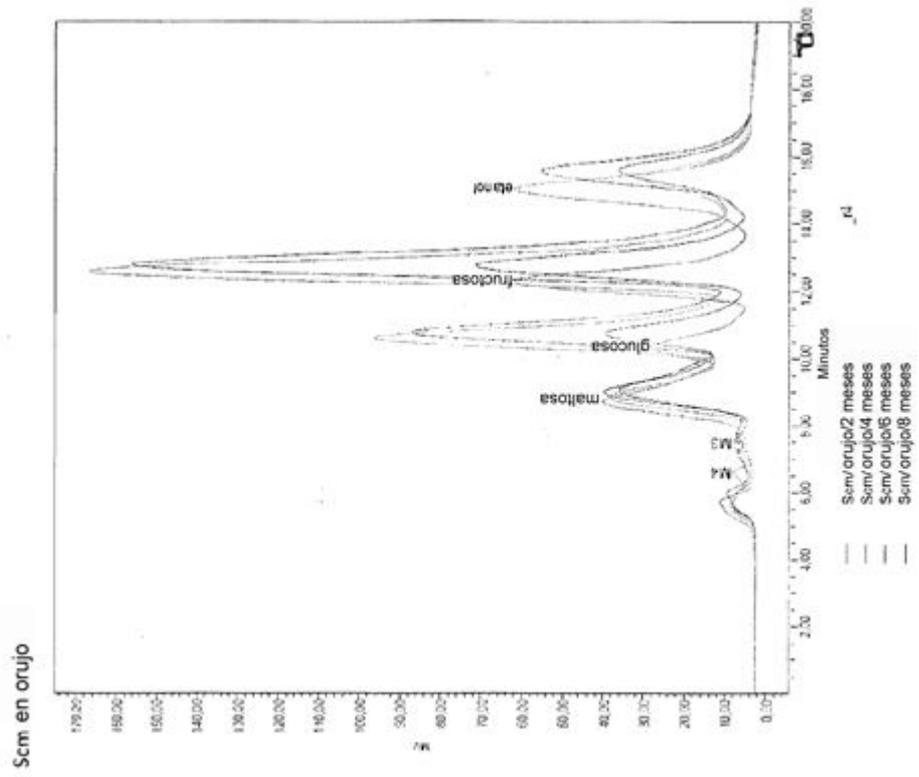


Fig. 10

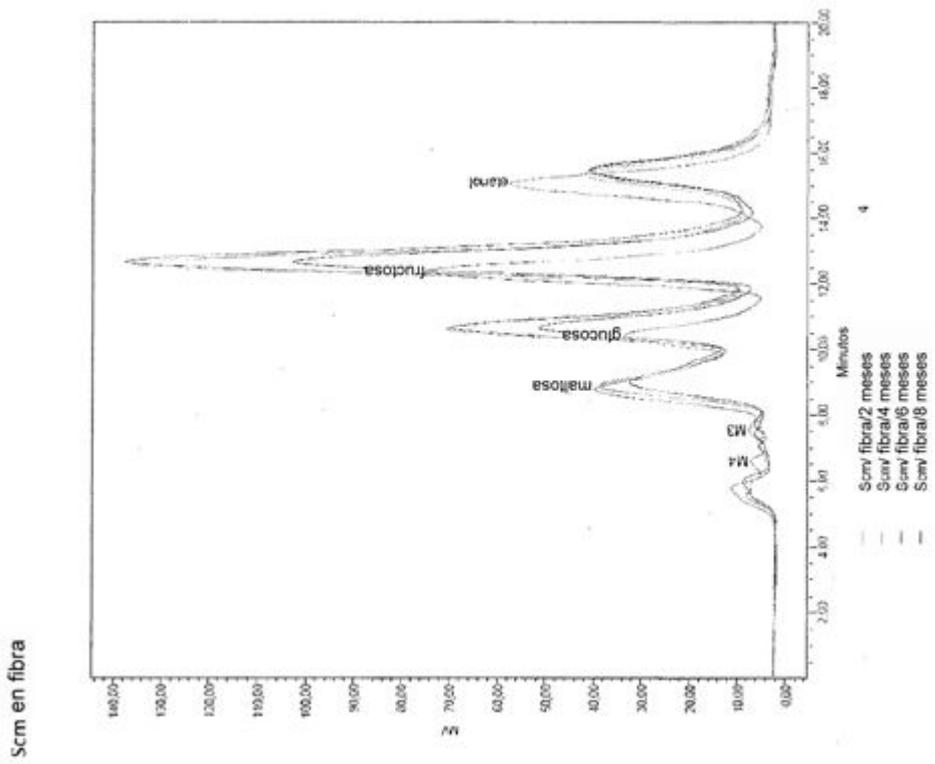


Fig. 9

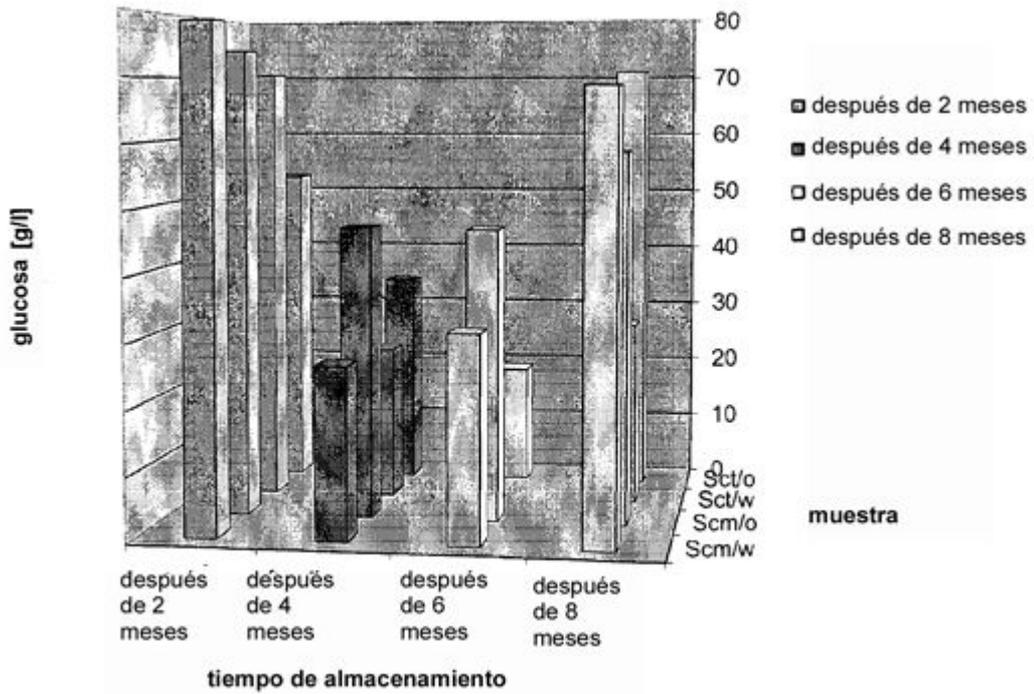
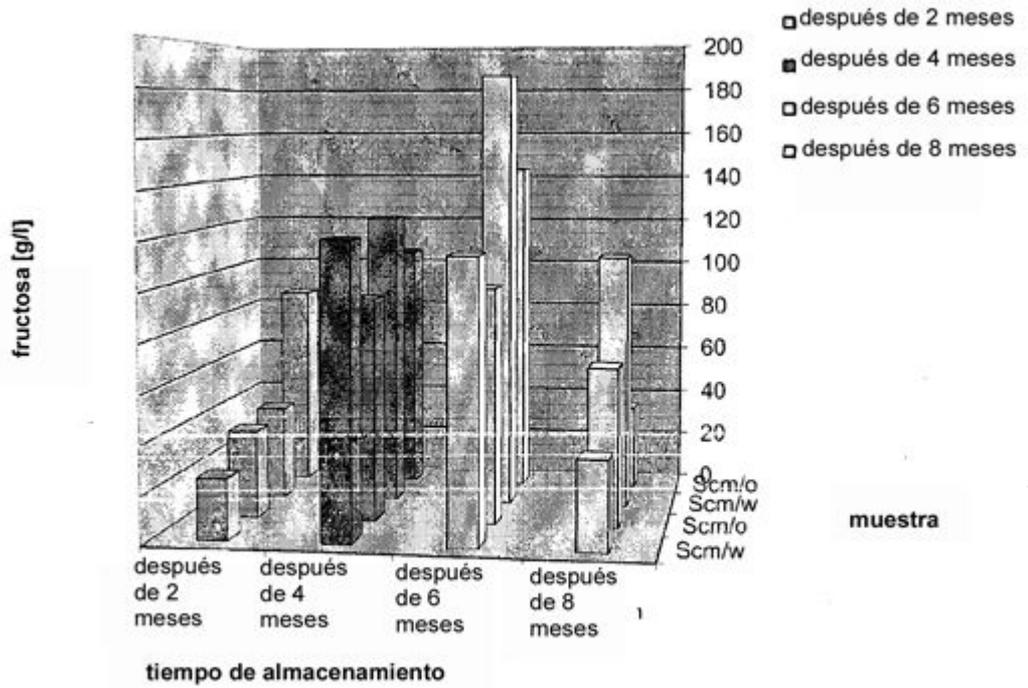


Fig. 11

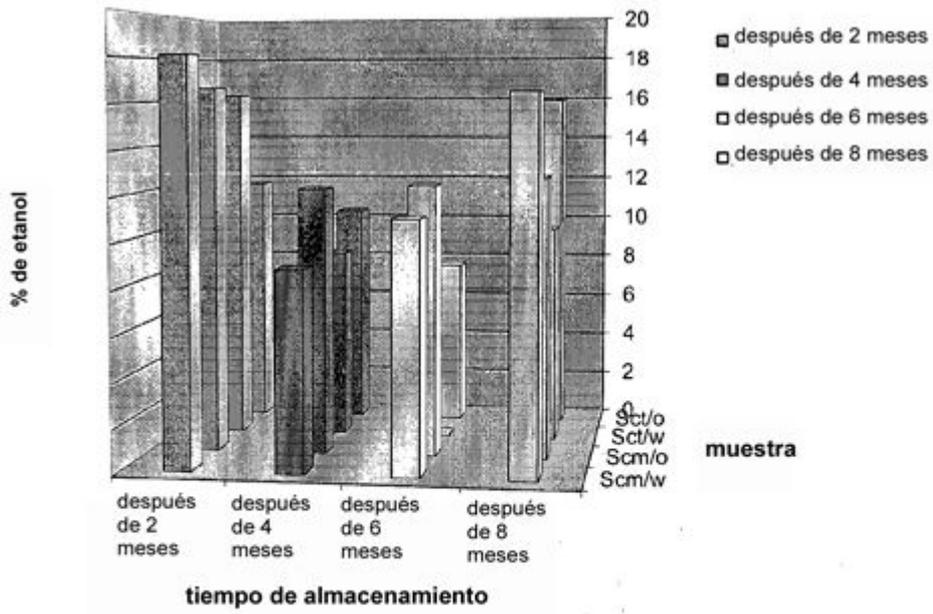


Fig. 12

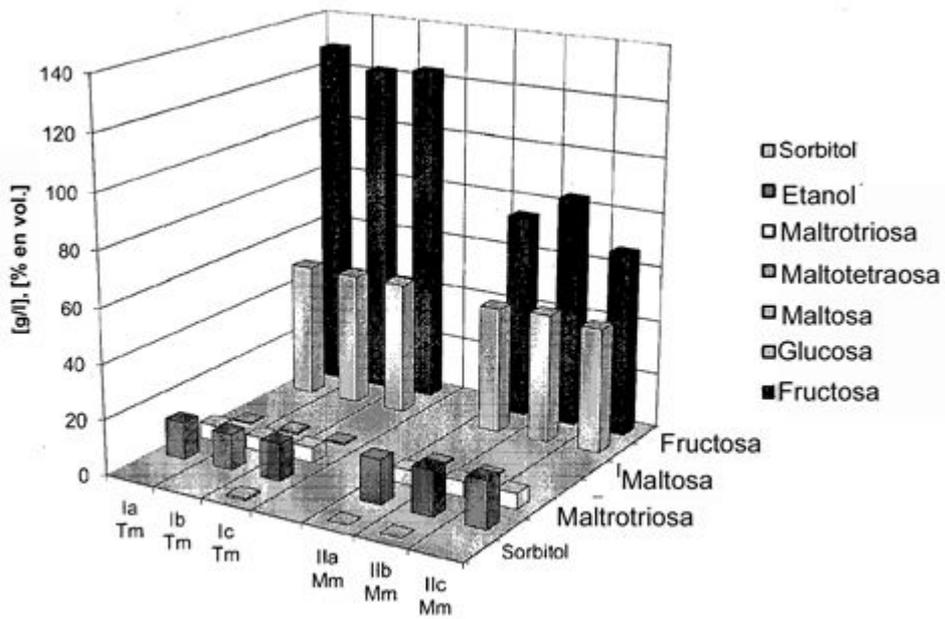


Fig. 13

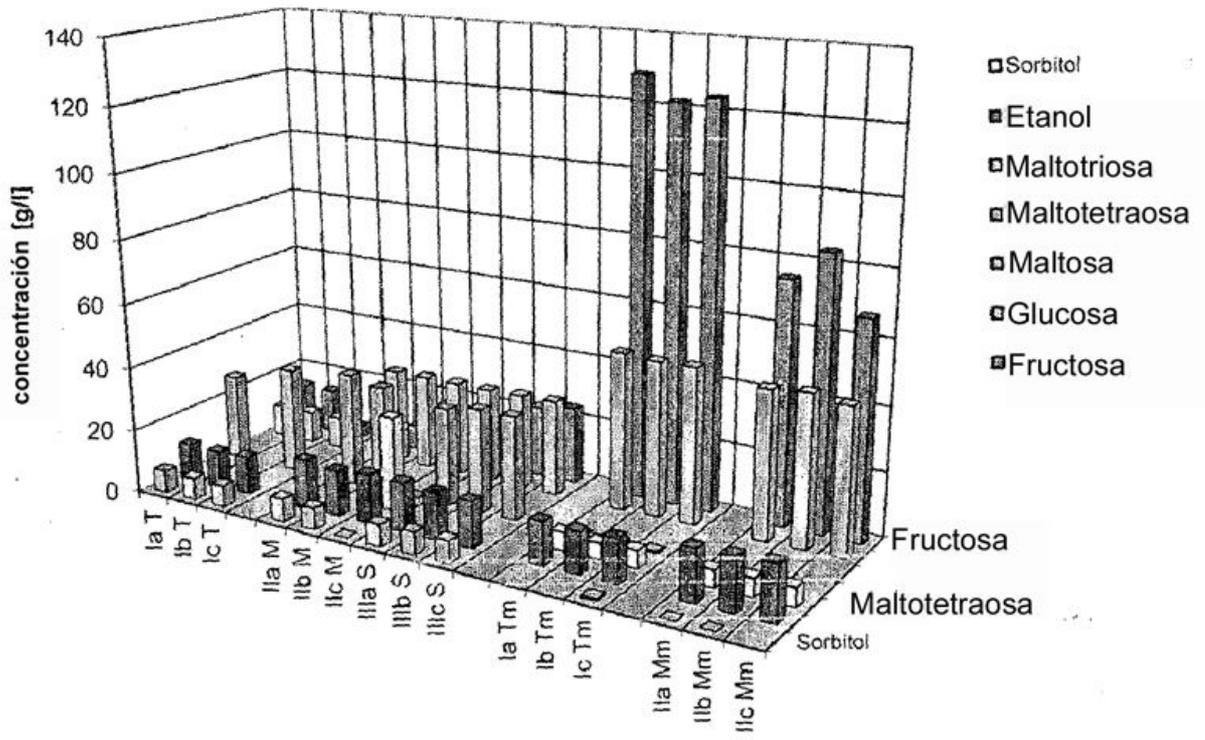


Fig. 14

AGACTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAATGCGCGGTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTCTGTGCTTTT
GTTATAGGACAATAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGC
ATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACA
AGAATTTTCGTAACGGAAATTTTAAATATTAATAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCCAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTG
ATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTTTCTACCAAAGAGAGGTTCT
CTTCTTGCTTCAGGAAAAATGCAGCTACGGCCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTCTTTTTCTGAG
CG

Fig. 15

Saccharomyces cerevisiae gen de ARNr 5.8S; ITS1 e ITS2; cepa CECT 11762
 ID de secuencia: [emb|AJ544252.1|](#) Longitud: 737 N.º de coincidencias: 1

Intervalo de 1: 87 a 682 [GenBank](#) [Gráficos](#) F [Siguiente coincidencia](#) [Coincidencia anterior](#)

Puntuación	Expect.	Identities	Huecos	Hebra Plus/Plus
1002 bits(542)	0.0	579/597(97%)	2/597(0%)	
Consulta 1		AGACTCCAGCCGGCCCTGCGCTTAAATGCGCGGTCTTGCTATTCCAACGGTGAGAGATT		60
Objeto 87		AGACTCCAGCCGGCCCTGCGCTTAAATGCGCGGTCTTGCTATTCCAACGGTGAGAGATT		146
Consulta 61		TCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTC		120
Objeto 147		TCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTC		206
Consulta 121		ATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAAACAAACAC		180
Objeto 207		ATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAAACAAACAC		266
Consulta 181		AAACAATTTTATCTATTCAATAATTTTTGTCAAAAAACAAGATTTTTCGTAACCTGGAAA		240
Objeto 267		AAACAATTTTATCTATTCAATAATTTTTGTCAAAAAACAAGATTTTTCGTAACCTGGAAA		326
Consulta 241		TTTTAAAATATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACG		300
Objeto 327		TTTTAAAATATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACG		386
Consulta 301		CAGCGAAATCCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC		360
Objeto 387		CAGCGAAATCCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC		446
Consulta 361		GCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCC		420
Objeto 447		GCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCC		505
Consulta 421		AACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTT		480
Objeto 506		AACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTT		565
Consulta 481		CATTGGATGTTTTTTTTTCTTACCAAGAGAGG-TTCTCTTCTTCTTCAGGAAAAAT		539
Objeto 566		CATTGGATGTTTTTTTTTCTTACCAAGAGAGGTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAAT		625
Consulta 540		GCAGCTACGSCCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTCTTTTTCTGAGCG		596
Objeto 626		GCAAGTACGSTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCG		682

Fig. 16

TCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTGTTTGTTTG
GCAAGAGCGTGAGAGCTTTTACTGGGCAAGTAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTG
CGCGGTCTTGCTAGGCTTGCAAGTTTCTTCTTGCTATTCCAACAGTGAGAGATTTCTCTGTTTTTGTATAGG
ACAATCAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCTGTCGAGC
AATCGGAGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCG
TAACTGAAAATTTTAAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTG
GTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTT
GGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGG
TATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTGTACTGAGCGTATTGGAACGTT
ATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATATTCTTAAAGTTGACCTCAAATCAGTAG

Fig. 17

Saccharomyces cerevisiae gen de ARNr 18S parcial; ITS1; gen de ARNr 5.8S; ITS y gen de ARNr 26S parcial, cepa HA1835. Alelo tipo S. kudriavzevii
 ID de secuencia: ambJAM267825.1 Longitud: 810 N.º de coincidencias: 1

Intervalo de 1 a 801	GenBank Gráficos		Siguiete Coincidencia	
	Puntuación	Expect.	Huecos	Hebra Plus/Plus
1469 bits(795)	0.0	800/802(99%)	2/802(0%)	
Consulta 1	TCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAATAATGGATT			60
Objeto 1	TCCGTA-GGTGARCTTCGGAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAATAATGGATT			59
Consulta 61	TGTTTGTTTTGGCAAGCCGTGAGAGCTTTTACTGGSCAAGTACACAAGAGATGGAGAGT			120
Objeto 60	TGTTTGTTTTGGCAAGCCGTGAGAGCTTTTACTGGSCAAGTACACAAGAGATGGAGAGT			119
Consulta 121	CCAGCCGGGCTTGGCTTAAGTGGCGGCTTCTGCTAGGCTTGGCAAGTTCTTTCTTGCTA			180
Objeto 120	CCAGCCGGGCTTGGCTTAAGTGGCGGCTTCTGCTAGGCTTGGCAAGTTCTTTCTTGCTA			179
Consulta 181	TTCCAAACAGTGGAGATTTCTCTGTTTTGTTATAGGACAAACAAAACCGTTCAATAC			240
Objeto 180	TTCCAAACAGTGGAGATTTCTCTGTTTTGTTATAGGACAAACAAAACCGTTCAATAC			239
Consulta 241	AACACACTGTGGAGTTTTATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGCTGTGGAGCAATCGGA			300
Objeto 240	AACACACTGTGGAGTTTTATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGCTGTGGAGCAATCGGA			299
Consulta 301	GCCCGAGGTAAACAAACACAAAACAATTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAG			360
Objeto 300	GCCCGAGGTAAACAAACACAAAACAATTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAAG			359
Consulta 361	AATTTTGTAACTGGAAATTTTAAAAATATYAAAACCTTCAACCAACGGATCTCTTGGTT			420
Objeto 360	AATTTTGTAACTGGAAATTTTAAAAATATYAAAACCTTCAACCAACGGATCTCTTGGTT			419
Consulta 421	CTTCGATCGATGAAGAAGGTAGCGAATTCGATACCTAATGTGAAATGGAGAAATTCCTG			480
Objeto 420	CTTCGATCGATGAAGAAGGTAGCGAATTCGATACCTAATGTGAAATGGAGAAATTCCTG			479
Consulta 481	AATCATGAACTCTTGAACGCAATTCGCGCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCTGTGTT			540
Objeto 480	AATCATGAACTCTTGAACGCAATTCGCGCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCTGTGTT			539
Consulta 541	GAGCGTCATTTCCCTCTCAACATTCGTGTTGGTGGTGGATGATACTCTTGGAGTTAAG			600
Objeto 540	GAGCGTCATTTCCCTCTCAACATTCGTGTTGGTGGTGGATGATACTCTTGGAGTTAAG			599
Consulta 601	TTGAAATTTCTGGCCTTTTCATGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGGTGC			660
Objeto 600	TTGAAATTTCTGGCCTTTTCATGGATGTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGGTGC			659
Consulta 661	TTGAGTATATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGGGGCTAATCTTTTTTG			720
Objeto 660	TTGAGTATATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGGGGCTAATCTTTTTTG			719
Consulta 721	TACTGAGCGTATGGAACTTATCGATAGCAAGGAGCGCTAGGCGAACAATATCTTA			780
Objeto 720	TACTGAGCGTATGGAACTTATCGATAGCAAGGAGCGCTAGGCGAACAATATCTTA			779
Consulta 781	AAGTTGACCTCAATCAGGTAG 801			
Objeto 780	AAGTTGACCTCAATCAGGTAG 801			

Fig. 18