

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 569**

51 Int. Cl.:

**A21D 2/14** (2006.01)

**C12N 1/18** (2006.01)

**C12N 15/01** (2006.01)

**A21D 8/04** (2006.01)

**C12R 1/865** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2011 PCT/FR2011/051550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12110711**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11743083 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2683248**

54 Título: **Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aptas para la producción de levaduras de panificación osmotolerantes y que presentan una resistencia intrínseca a los ácidos orgánicos débiles, sus procedimientos de preparación y aplicaciones**

30 Prioridad:

**18.02.2011 FR 1151354**

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

**28.05.2018**

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (100.0%)  
41, rue Etienne Marcel  
75001 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LADRIERE, JEAN-MARC;  
BARTOLUCCI, JEAN-CHARLES;  
SUCHER, FABIENNE y  
THOMAS, BENOIT**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 669 569 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

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aptas para la producción de levaduras de panificación osmotolerantes y que presentan una resistencia intrínseca a los ácidos orgánicos débiles, sus procedimientos de preparación y aplicaciones

5 **Solicitud anterior**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud francesa número FR 1.151.354 presentada el 18 de febrero de 2011.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aptas para la producción de levaduras de panificación, a sus procedimientos de preparación, a las levaduras de panificación producidas a partir de estas cepas, a las masas panaderas que las contienen así como a los procedimientos y productos de panificación susceptibles de ser obtenidos mediante la utilización de estas masas. Más especialmente la presente invención se refiere en su aspecto más general a las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, llamadas industriales, aptas para producir levaduras de panificación osmotolerantes y que presentan una resistencia intrínseca a los ácidos orgánicos débiles.

**Técnica anterior**

20 El documento WO 96/38.538 muestra levaduras resultantes de cepas de *S. cerevisiae* mejoradas que presentan una osmotolerancia aumentada en cuanto a que producen desprendimientos gaseosos (producción de CO<sub>2</sub>) ventajosos en masas panaderas que contienen altas concentraciones de azúcar de 16% a 25% (porcentajes del panadero). Este documento no dice nada en relación al comportamiento de estas levaduras en presencia de inhibidores de mohos, tales como los ácidos orgánicos débiles.

25 El documento US 4.318.991 divulga un procedimiento de producción de levaduras de panadería que presentan una actividad fermentativa elevada en una masa panadera incluso en presencia de agentes inhibidores de mohos, tales como ácidos orgánicos débiles como el ácido acético o el ácido propiónico. Este procedimiento comprende una etapa de adición de dicho ácido, principalmente durante la multiplicación de la levadura y esto en la última fase de su propagación de forma que se "adapte" la levadura a dicho ácido, principalmente presente en forma de propionato de calcio (denominado en adelante calpro o también ppc) en las masas panaderas. Este documento no precisa el comportamiento de las levaduras así producidas en masas de contenido elevado en azúcar.

30 Un documento, a nombre de la Solicitante, US 4.346.115 describe un procedimiento de preparación de una levadura de panadería que se hace resistente a los ácidos orgánicos débiles a partir de una cepa osmotolerante por adición discontinua de melaza durante el último ciclo de su multiplicación.

35 Otro documento, también a nombre de la Solicitante EP 1.559.322, muestra cepas que permiten producir, después de adaptación a los ácidos débiles, levaduras todavía más eficaces, según ensayos bien conocidos por el experto en la técnica, que una cepa testigo que ha sido la referencia durante una veintena de años para obtener levaduras comerciales eficaces en masas azucaradas en presencia de inhibidores de mohos.

Además del hecho de que la adaptación a los ácidos débiles, mencionada anteriormente, en forma, por ejemplo, de propionato de calcio, en el transcurso de la multiplicación de la cepa, a un determinado coste, este último puede también presentar un impacto negativo sobre la actividad fermentativa de la levadura, en particular en presencia de masas azucaradas o muy azucaradas.

40 El punto común desventajoso de estas técnicas de la técnica anterior que tienen como objetivo mejorar la resistencia de levaduras de panificación a los ácidos débiles inhibidores de mohos en las masas panaderas azucaradas o no azucaradas, adaptando las cepas de las que proceden estos últimos, es el de no conferir a las levaduras más que una resistencia provisional/transitoria y no permanente a los ácidos débiles. La adaptación consiste en exponer las células de levadura a una cantidad subletal de ácido débil durante su fase de crecimiento; esta exposición previa permite a continuación a las células adaptadas tolerar mejor la presencia del mismo ácido débil cuando se ponen en condiciones de fermentación. En algunos casos, un ácido débil dado puede conferir una adaptación frente a la presencia posterior de otro ácido débil en fase de fermentación. Estas nociones se ejemplifican en el artículo de Ferreira *et al.* (1997) *International Journal of Food Microbiology* 36, 145-153. Los mecanismos de la adaptación a los ácidos débiles han sido objeto de varios estudios. Algunos de estos estudios se han recogido en el artículo de revista de Piper *et al.* (2001), *Microbiology* 147, 2635-2642. Allí se constata que la adaptación se basa en mecanismos celulares que implican varias proteínas entre ellas algunas bombas de membranas. Estos mecanismos son no genéticos y en esencia transitorios: se llevan a cabo por las células en reacción al estrés que representa el ácido débil pero terminan por desaparecer en ausencia de este estrés: las células previamente adaptadas vuelven al estado de células no adaptadas.

Otros procedimientos todavía mucho más complejos, tales como los descritos en los documentos EP 645.094 o WO 99/51.746, muestran una modificación genética de las cepas aptas para producir levaduras de panadería de forma que las vuelva intrínsecamente resistentes a los ácidos débiles.

5 La Solicitante, prosiguiendo sus trabajos de investigación de cepas siempre más eficaces, ha constatado que una cepa particular originaria de su colección interna de cepas osmotolerantes presenta un patrimonio genético tal que hibridándola o mutándola, además según procedimientos clásicos, se obtiene una cepa apta para producir una levadura de panificación particularmente eficaz y que no necesita, de forma muy sorprendente, ninguna adaptación antes de su introducción en masas muy azucaradas que contienen un ácido débil en forma de propionato de calcio (denominado calpro o ppc), por ejemplo.

10 Es este descubrimiento el que está en la base de la presente invención.

### Resumen de los objetivos de la presente invención

15 También en su aspecto más general, la presente invención se refiere a una cepa de *S. cerevisiae* apta para producir una levadura de panificación que presenta una osmotolerancia y una resistencia intrínseca a los ácidos orgánicos débiles y preparada a partir de una cepa industrial de *S. cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Curie, calle del doctor Roux, 25, 75724 Paris Cedex 15) con el número I-4341. Más específicamente, la presente invención se refiere a una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* susceptible de ser obtenida:

20 - mediante un procedimiento de hibridación que comprende la hibridación de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada en la CNCM el 8 de julio de 2010 con el número I-4341 con la cepa registrada en la CNCM el 9 de febrero de 2011 con el número I-4448, y al menos una etapa de selección del híbrido obtenido elegido en el grupo formado por:

25 i una actividad fermentativa, medida con un fermentómetro de Burrows y Harrison en el ensayo A5' o en los ensayos A5 y A5', siendo el híbrido seleccionado tal que su desprendimiento gaseoso es superior en al menos 10% y preferentemente de 15 a 25% al de una cepa testigo que consiste en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341,

30 ii un tiempo de fermentación final en el procedimiento *No-time Dough* sobre masa que contiene 15%, 18%, 23% o 25% de azúcar (porcentajes del panadero) en presencia de 0,4% de propionato de calcio, siendo los híbridos seleccionados aptos para producir levaduras de panificación por multiplicación, en ausencia de adaptación al propionato de calcio, que proporcionan un tiempo de fermentación final comprendido entre 85% y 105% y preferentemente entre 95% y 105% del tiempo de fermentación final proporcionado por una levadura de panificación testigo producida a partir de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341 por multiplicación con adaptación de ésta a la presencia de propionato de calcio,

o,

35 - mediante un procedimiento de mutación aleatoria de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341, y al menos una etapa de selección del mutante obtenido elegido entre el grupo formado por:

40 i una actividad fermentativa, medida con el fermentómetro de Burrows y Harrison en el ensayo A5'', siendo el mutante seleccionado tal que su desprendimiento gaseoso es superior de 5 a 20% al de una cepa testigo que consiste en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341.

45 ii un tiempo de fermentación final en el procedimiento *No-Time Dough* sobre masa que contiene 15%, 18%, 23% o 25% de azúcar (porcentajes del panadero) en presencia de 0,4% de propionato de calcio, siendo el mutante seleccionado apto para producir levaduras de panificación por multiplicación, en ausencia de adaptación al propionato de calcio, que proporcionan un tiempo de fermentación final comprendido entre 90% y 105% del proporcionado por una levadura de panificación testigo producida a partir de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341 por multiplicación con adaptación de ésta a la presencia de propionato de calcio,

50 caracterizada por que dicha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es apta para producir, por multiplicación en ausencia de adaptación a la presencia de ácido(s) débil(es), una levadura de panificación que presenta una osmotolerancia y una resistencia intrínseca a los ácidos orgánicos débiles.

En algunos modos de realización, dicha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es la cepa registrada el 11 de mayo de 2010 ante la CNCM con el número I-4312.

En otros modos de realización, dicha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es la cepa registrada el 11 de mayo de 2010 ante la CNCM con el número I-4313.

5 En todavía otros modos de realización, dicha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es la cepa registrada el 8 de diciembre de 2010 ante la CNCM con el número I-4409 o la cepa registrada el 8 de diciembre de 2010 ante la CNCM con el número I-4410.

Según los conocimientos de la Solicitante, es la primera vez que se muestra un procedimiento de producción de levadura de panificación que le confiere a la vez una osmotolerancia y una resistencia intrínseca a los ácidos débiles apartándose de los procedimientos costosos y/o complejos de la técnica anterior.

10 La presente invención también tiene como objetivo una levadura de panificación susceptible de ser obtenida por multiplicación sin adaptación a la presencia de ácido(s) débil(es) de una cepa según la presente invención u obtenida mediante un procedimiento descrito anteriormente.

La Solicitante ha constatado que cuando dichas levaduras de panificación se producen con adaptación se amplifica el beneficio en términos de reducción del *proof time* (levantamiento).

La presente invención tiene además como objetivos:

- 15 - una masa panadera que contiene una levadura de panificación según la presente invención;
- eligiéndose dicha masa panadera preferentemente entre las masas en las que la fermentación se realiza en presencia a la vez de una presión osmótica debida a la presencia de al menos 15% de azúcar, preferentemente al menos 18% de azúcar, preferentemente todavía al menos 23% de azúcar (porcentajes del panadero) y en presencia de un inhibidor de mohos de tipo ácido orgánico débil, preferentemente en forma de propionato de calcio.
- 20

La presente invención también tiene como objetivo un procedimiento de preparación de un producto cocido de panificación mediante la utilización de dicha masa panadera.

La presente invención también tiene como objetivo un producto de panificación susceptible de obtenerse mediante dicho procedimiento de preparación.

25 Se van a describir ahora otras características y ventajas de forma más detallada mediante ejemplos de realización de la invención dados de modo puramente ilustrativo y no limitativo.

#### Descripción detallada de la presente invención

En la presente invención, se entiende por levadura de panificación osmotolerante, una levadura que presenta al menos una de las propiedades siguientes:

- 30
- actividad invertasa inferior a 35 unidades, preferentemente inferior a 30, y de forma todavía más preferida inferior a 20, estando definida la unidad de invertasa como la producción de un micromol de azúcares reductores en 5 minutos por mg de materia seca de levadura a 30°C y a un pH de 4,7 sin plasmólisis de la levadura, es decir medio micromol de sacarosa invertida (ensayo detallado en la patente US 4.318.929);
  - 35 • pasa favorablemente al menos uno de los siguientes ensayos en el fermentómetro de Burrows y Harrison descrito en el *Journal of Institute of Brewing*, vol LXV, N° 1, enero-febrero 1959 y que se definen en la patente EP 1.559.322 como A5, A5', A6 y A6';
  - pasa favorablemente al menos uno de los siguientes ensayos de panificación por comparación con la cepa I-4341 adaptada y siempre en presencia en la masa panadera de propionato de calcio al 0,4% y elevados contenidos de azúcares, ensayos denominados en la presente invención NT15%+, NT18%+, NT23%+, NT25%+: corresponden a medidas del tiempo de fermentación final en esquemas de "No-Time Dough" es decir procedimientos directos en los que prácticamente no hay primera fermentación entre un amasado intensivo y la división de la masa, fermentándose los trozos de masa obtenidos en molde entre 35°C y 40°C. Esta última fermentación, que es la fermentación esencial en dicho procedimiento se denomina "proof" en inglés. El *proof-time* o tiempo de última fermentación se define como el tiempo necesario para que una masa de panadería alcance una altura dada en el molde, correspondiente al desarrollo deseado de la masa para que se introduzca en el horno.
- 40
- 45

Preferentemente, una levadura osmotolerante según la invención posee al menos dos de las propiedades tales como se han definido en los ensayos citados anteriormente.

50 En la presente invención se entiende por resistencia intrínseca de una levadura a los ácidos orgánicos débiles, presentes por ejemplo en forma de propionato de calcio, una resistencia ni inducida, por ejemplo por adaptación, ni adquirida después de modificación genética de dicha levadura distinta a por hibridación o mutación de la cepa de la que procede y tal como se indica a continuación.

En la presente invención se entiende por cepa industrial, una cepa que contrariamente a las cepas denominadas de laboratorio no es necesariamente haploide o diploide sino que la ploidía a menudo es más compleja.

Se entiende por perfil Ty de una cepa, cualquier perfil obtenido mediante PCR utilizando iniciadores dirigidos hacia secuencias diana que corresponden a "cicatrices" genéticas que resultan de movimientos de transposones (Ty).

5 Aproximadamente 100 copias de estas secuencias están presentes en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, más particularmente en las secuencias próximas a los genes que codifican para los ARNt. El número y la distribución sobre el genoma de los elementos Ty es variable de una cepa a otra y permite poner de manifiesto un polimorfismo importante entre cepas. Esta técnica se describe ahora en la norma DIN CEN/TS 15790 (marzo 2009) para la identificación de las levaduras probióticas para la alimentación animal.

10 Se entiende por cartografía de loci de caracteres cuantitativos (*QTL mapping*) una técnica que consiste en la construcción de mapas genéticos que permiten localizar loci (regiones del cromosoma) implicados en la variación de caracteres cuantitativos ligados a loci más fácilmente identificables, los marcadores.

En el marco de la presente invención todos los porcentajes mencionados en los ensayos de selección, salvo mención contraria, se dan en porcentajes llamados del panadero, bien conocidos por el experto en la técnica, estos porcentajes representan porcentajes en masa de los ingredientes (por ejemplo azúcares, propionato de calcio, etc.) presentes en relación a la masa de la harina, que representa el 100%.

15

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Preparación de los híbridos

20 Las cepas híbridas I-4312 y I-4313, objeto de la presente invención se producen por cruzamientos sistemáticos entre sí de cepas de la colección interna de la Solicitante elegidas como osmotolerantes y/u osmotolerantes y poco sensibles a la presencia de los ácidos orgánicos débiles o sus sales, utilizados como inhibidores de mohos, tales como los registrados en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos del Instituto Pasteur, calle Doctor Roux 25, 75724 Paris Cedex 15, Francia, el 8 de julio de 2010 con el número I-4341 y el 9 de febrero de 2011 con el N° I-4448.

25 El programa de hibridación se realiza según técnicas clásicas como las descritas en los capítulos "Técnicas y Protocolos" 21 a 23 de la obra "*Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2000 Edition*" de D. Burke, D. Dawson y T. Stearns, Cold Spring Harbor Laboratory Press (ISBN 0-87969-588-9).

### EJEMPLO 2: Preparación de las levaduras según la invención a partir de los híbridos del Ejemplo 1

30 Para producir las levaduras de panificación según la invención se ponen en cultivo las cepas híbridas, tales como las obtenidas en el Ejemplo 1, en matraces o en fermentadores en medios conocidos, pero desprovistos de ácido débil.

En matraz, se podrá utilizar un medio de cultivo YPD tal como se describe en el apéndice A dedicado a los medios de cultivo de la obra "*Methods in Yeast Genetics, A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2000 Edition*" de D. Burke, D. Dawson y T. Stearns, Cold Spring Harbor Laboratory Press (ISBN 0-87969-588-9).

35 En fermentador, de forma convencional, las condiciones de cultivo son tales que el metabolismo de la cepa de levadura sea esencialmente respiratorio y/o tal que no haya esencialmente producción de etanol.

El término "esencialmente" significa que estas condiciones se verifican durante el tiempo total del cultivo, pero que es posible que puntualmente, estas condiciones no se verifiquen en modo semicontinuo, por ejemplo durante las primeras horas del cultivo equivalentes a una duración comprendida entre 1/4 a 1/3 de la duración de cultivo, y en particular durante las 5 primeras horas de un cultivo en modo semicontinuo.

40 La expresión "el metabolismo de la cepa de levadura es esencialmente respiratorio" significa que el carbono está oxidado, y no fermentado, durante el tiempo total del cultivo, pudiendo estar fermentada una parte del carbono de forma transitoria.

45 La expresión "esencialmente no hay producción de etanol" significa que la concentración de etanol al finalizar el cultivo es inferior a 1%, preferentemente inferior a 0,1%, más preferentemente inferior a 0,01%, más preferentemente inferior a 0,001%.

El experto en la materia sabe cómo ajustar los parámetros de cultivo de una cepa de levadura dada para que las condiciones de cultivo sean tales que el metabolismo de dicha cepa sea esencialmente respiratorio y/o tales que no haya esencialmente producción de etanol.

La cepa de levadura según la invención se pone en presencia del medio de cultivo en condiciones aerobias.

50 Preferentemente, la cepa de levadura según la invención se pone en presencia del medio de cultivo en un fermentador adaptado a la producción de levadura. El volumen del fermentador puede variar desde algunos mililitros a varios metros cúbicos.

El fermentador también se denomina reactor a continuación.

El fermentador se adapta preferentemente para un cultivo en condiciones aerobias.

La cepa de levadura se pone preferentemente en presencia del medio de cultivo en el marco de un cultivo en modo semicontinuo y/o en modo continuo.

5 La expresión "cultivo en modo semicontinuo" o "cultivo semicontinuo" o "modo semicontinuo", denominado también "*fed-batch*", designa aquí un cultivo en un fermentador que se alimenta progresivamente por el medio de cultivo, pero en el que no se retira ningún volumen de medio. En dicho procedimiento, el volumen de cultivo es variable (y creciente) en el fermentador. El caudal de alimentación en un cultivo en modo semicontinuo es constante o variable.

10 Un ejemplo de cultivo semicontinuo es un cultivo realizado en las condiciones descritas en el libro de referencia "*Yeast Technology*", segunda edición, 1991, G. Reed y T. W. Nagodawithana, publicado por Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8.

El medio de cultivo comprende como constituyentes la mezcla de azúcar y los otros elementos necesarios para el crecimiento de las levaduras.

15 Los otros elementos necesarios para el crecimiento de las levaduras son los siguientes: al menos una fuente de nitrógeno, al menos una fuente de azufre, al menos una fuente de fósforo, al menos una fuente de vitaminas y/o al menos una fuente de minerales.

Estos otros elementos son proporcionados en cantidades suficientes para no constituir un factor limitante del crecimiento de las levaduras.

20 La fuente de nitrógeno se proporciona por ejemplo en forma de sulfato de amonio, hidróxido de amonio, fosfato de diamonio, amoniaco, urea y/o una combinación de éstos.

La fuente de azufre se proporciona por ejemplo en forma de sulfato de amonio, sulfato de magnesio, ácido sulfúrico y/o una combinación de éstos.

La fuente de fósforo se proporciona por ejemplo en forma de ácido fosfórico, fosfato de potasio, fosfato de diamonio, fosfato de monoamonio y/o una combinación de éstos.

25 La fuente de vitaminas se proporciona por ejemplo en forma de melaza, hidrolizado de levadura, disolución de vitamina pura o una mezcla de vitaminas puras y/o una combinación de éstos.

La fuente de vitaminas aporta a la levadura el conjunto de vitaminas en cantidades al menos equivalentes a las recomendadas en las obras de referencia. Varias fuentes de vitaminas pueden estar asociadas.

30 La fuente de minerales se proporciona por ejemplo en forma de melaza, una mezcla de sales minerales y/o su combinación.

La fuente de minerales aporta a la levadura el conjunto de los macroelementos y oligoelementos en cantidades al menos equivalentes a las recomendadas en las obras de referencia. Varias fuentes de minerales pueden estar asociadas.

Una misma sustancia puede aportar varios elementos diferentes.

35 Las condiciones de producción de la levadura de panadería en fermentador se explican en detalle por A. Loiez en el capítulo "*Production de levure de panification par biotechnologie*" *Techniques de l'Ingenieur*, Referencia J6013 del 10 de marzo de 2003.

40 El mismo medio de cultivo de los híbridos según la invención se utiliza para la cepa de referencia I-4341 a la que se van a comparar, pero procediendo por su parte a una etapa suplementaria denominada de adaptación según la técnica descrita en las patentes US 4.318.991 o US 4.346.115 o según la enseñanza combinada de estos dos documentos.

El procedimiento de preparación de la levadura de panificación comprende al menos las dos primeras etapas del conjunto de las siguientes etapas que consisten en:

- multiplicar una cepa pura en condiciones semiaerobias y luego aerobias,
- 45 - separar por centrifugación la levadura producida de esta forma de su medio de cultivo, de forma que se obtenga una "crema de levadura" líquida que contenga de 14% a 25% de materia seca o más si la crema de levadura se mezcla con productos osmóticos,
- filtrar la crema de levadura líquida así obtenida, preferentemente sobre un filtro rotatorio a vacío y obtener una levadura fresca deshidratada que contenga de 26 a 35% de materia seca,

- mezclar dicha levadura así obtenida, bien en forma de panes de levadura fresca, bien en forma de levadura fresca desmenuzada con aproximadamente 30% de materia seca, o bien también en forma de partículas, preferentemente gránulos, si la levadura está destinada a ser secada,
- secar de forma moderada, en una corriente de aire caliente, por ejemplo por fluidificación, las partículas de levadura obtenidas después de extrusión,
- embalar antes de comercialización.

**EJEMPLO 3: Comparación de las prestaciones de las levaduras no adaptadas según la invención con la cepa testigo adaptada**

**Ejemplo 3.1.: Presentación de los ensayos**

**10 3.1.1. Ensayos en el fermentómetro**

Los ensayos se realizan mediante el fermentómetro de Burrows y Harrison descrito en el *Journal of Institute of Brewing*, vol. LXV, N° 1, enero-febrero 1959 y se definen de la siguiente forma:

**Ensayo A5**

Se prepara una suspensión de levadura de la siguiente forma:

- 15 1.- 200 mg de materia seca de levadura que se va a ensayar,
- 2.- 5 mL de una disolución de 108 g/l de NaCl y 16 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y
- 3.- se lleva a un volumen de 20 mL con agua destilada.

20 Se equilibran 15 mL de la suspensión anterior (es decir 150 mg de materia seca de levadura) a una temperatura de 30°C durante 15 minutos. A esta suspensión se le añade una mezcla de 20 g de harina y 4 g de sacarosa previamente equilibrados durante una noche a 30°C. El conjunto se homogeneiza durante un tiempo de 35 segundos.

La masa formada se incuba en un recipiente cerrado herméticamente colocado a 30°C. El desprendimiento gaseoso (expresado en mL a 760 mm de Hg) se registra para un tiempo total de 120 minutos (esta duración se puede adaptar).

**25 Ensayo A5'**

Protocolo idéntico al A5 salvo que:

- 1. Se añaden 500 µL de una disolución al 16% (p/v) de propionato de calcio (calpro) por encima de la mezcla de harina + azúcar justo antes de la fase de mezcla de 35 segundos.

**Ensayo A5''**

30 Protocolo idéntico al A5 salvo que:

- 1. Se añade 1 mL de una disolución al 16% (p/v) de propionato de calcio por encima de la mezcla de harina + azúcar justo antes de la fase de mezcla de 35 segundos.

**Ensayo A6**

Protocolo idéntico al PS4g salvo que:

- 35 1. Se prepara una suspensión de levadura con 400 mg de materia seca (en lugar de 200 mg), lo que supone que se utiliza en el ensayo una cantidad de 300 mg de materia seca de levadura.
- 2. La mezcla de harina + azúcar se compone de 25 g de harina (en lugar de 20 g) y 6,5 g de sacarosa (en lugar de 4 g).

**Ensayo A51 y A51' (con propionato de calcio)**

40 Para levadura fresca

Se prepara una suspensión de levadura de la siguiente forma:

- 1. 400 mg de materia seca de la levadura que se va a ensayar,

## ES 2 669 569 T3

2. se disuelve en el volumen de agua destilada necesario para alcanzar un volumen total de agua de 6,8 mL teniendo en cuenta el agua aportada por la levadura fresca (normalmente 70% del peso de una levadura prensada),
3. se equilibra a 30°C durante 22 minutos, y
4. se añaden 4,5 mL de una disolución de 73,6 g/kg de NaCl y se homogeneiza.

5 A la suspensión anterior se le añaden 20 g de harina y 3 g de sacarosa. El conjunto se mezcla durante un tiempo de 35 segundos.

El desprendimiento gaseoso (expresado en mL a 760 mm de Hg) se registra durante un tiempo total de 120 minutos (este tiempo se puede adaptar). La medida arranca 36 minutos después del comienzo del protocolo.

10 Este protocolo existe en una variante que incluye la presencia de propionato de calcio. En este caso, en la etapa 4 de la preparación de la suspensión de levadura, la disolución de 73,6 g/kg de NaCl contiene además 17,4 g/kg de propionato de calcio.

### Para levadura seca

Se mezclan 20 g de harina, 3 g de sacarosa y 400 mg de materia seca de la levadura que se va a ensayar. Se equilibra a 30°C durante 12 minutos.

15 Se añaden 6,8 mL de agua destilada y 4,5 mL de una disolución de 73,6 g/kg de NaCl y se homogeneiza durante 35 segundos.

36 minutos después de la adición de agua destilada, se procede a una segunda homogeneización idéntica a la primera.

20 El desprendimiento gaseoso (expresado en mL a 760 mm de Hg) se registra durante un tiempo total de 120 minutos (este tiempo se puede adaptar). La medida arranca 60 minutos después del comienzo del protocolo.

### ***Ensayo A61 y A61' (con propionato de calcio)***

#### Para levadura fresca

Se prepara una suspensión de levadura de la siguiente forma:

1. 700 mg de materia seca de la levadura que se va a ensayar,
- 25 2. Se disuelven en el volumen de agua destilada necesario para alcanzar un volumen total de agua de 7,5 mL teniendo en cuenta el agua aportada por la levadura fresca (normalmente 70% del peso de una levadura prensada).
3. Se equilibra a 30°C durante 22 minutos, y
4. Se añaden 5,75 mL de una disolución al 73,6 g/kg de NaCl y se homogeneiza.

A la suspensión anterior se le añaden 25 g de harina y 6,5 g de sacarosa.

30 El conjunto se mezcla durante un tiempo de 35 segundos.

El desprendimiento gaseoso (expresado en mL a 760 mm de Hg) se registra durante un tiempo total de 120 minutos (este tiempo se puede adaptar). La medida arranca 36 minutos después del comienzo del protocolo.

35 Este protocolo existe en una variante que incluye la presencia de propionato de calcio. En este caso, en la etapa 4 de la preparación de la suspensión de levadura, la disolución de 73,6 g/kg de NaCl contiene además 17,4 g/kg de propionato de calcio.

### Para levadura seca

Se mezclan 25 g de harina, 6,5 g de sacarosa y 700 mg de materia seca de la levadura que se va a ensayar. Se equilibra a 30°C durante 12 minutos.

40 Se añaden 7,5 mL de agua destilada y 5,75 mL de una disolución de 73,6 g/kg de NaCl y homogeneizar durante 35 segundos.

36 minutos después de la adición de agua destilada, se procede a una segunda homogeneización idéntica a la primera.

El desprendimiento gaseoso (expresado en mL a 760 mm de Hg) se registra durante un tiempo total de 120 minutos (este tiempo se puede adaptar). La medida arranca 60 minutos después del comienzo del protocolo.

**3.1.2. Ensayos de panificación**

Se ensayan 4 recetas:

- la receta PT1 que contiene 15% en masa (porcentaje de panadero) de sacarosa y 0,4% en masa (porcentaje del panadero) de propionato de calcio;
- 5 - la receta PT2 que contiene 18% en masa (porcentaje del panadero) de sacarosa y 0,4% en masa (porcentaje del panadero) de propionato de calcio;
- la receta PT3 que contiene 23% en masa (porcentaje del panadero) de sacarosa y 0,4% en masa (porcentaje del panadero) de propionato de calcio;
- 10 - la receta PT4 que contiene 25% en masa (porcentaje del panadero) de sacarosa y 0,4% en masa (porcentaje del panadero) de propionato de calcio.

En los ensayos 1 a 4, se mide, en un procedimiento de panificación dado y con las recetas dadas, la desviación en el *proof time* entre, por una parte, una levadura seca obtenida con la cepa que se va a evaluar, y por otra parte, una levadura seca obtenida con una cepa testigo "T". Las prestaciones se miden en porcentajes de desviación entre la cepa ensayada y la cepa testigo. Una desviación negativa corresponde a prestaciones superiores a las de la cepa testigo.

15 Las recetas utilizadas en los ensayos y expresadas en porcentaje del panadero se recogen en la siguiente tabla. Esta tabla comprende también el detalle de los diferentes porcentajes utilizados.

	<b>No Time 15%+</b>	<b>No Time 18%+</b>	<b>Rotimani 23%+</b>	<b>No Time 25%+</b>
<b>ENSAYO</b>	<b>PT1</b>	<b>PT2</b>	<b>PT3</b>	<b>PT4</b>
<b>FÓRMULAS</b>	<b>Receta 1</b>	<b>Receta 2</b>	<b>Receta 3</b>	<b>Receta 4</b>
Harina	100%	100%	100%	100%
Agua	54%	52%	45%	50%
Sacarosa	15%	18%	23%	25%
Sal	1,7%	1%	1,5%	1,7%
Levadura seca	1,5%	1%	2,3%	2%
Materia grasa	7,5%	5%	10%	7,5%
Mejorador	-	0,5%	0,3%	-
	1%	-	-	1%
Polvo de leche	-	4%	3%	-
Huevos	-	6%	10%	-
Calpro	0,4%	0,4%	0,3%	0,4%

<b>TEMPERATURAS</b>	<b>Receta 1</b>	<b>Receta 2</b>	<b>Receta 3</b>	<b>Receta 4</b>
Local + Harina + Agua	64°C	70°C	70°C	64°C
Baño María Amasadoras	22,5°C	23,5°C	24,5°C	22,5°C
Masa	27°C	28°C	29°C	27°C

## ES 2 669 569 T3

DIAGRAMA	Receta 1	Receta 2	Receta 3	Receta 4
Amasado Mac Duffy	L5 R5 H4	L1 + MG1 L1 H4	L1+MG1  L1 H5,5	L5 R5 H4
Fermentación en Masa	10 min	15 min	10 min	10 min
División	320 g	320 g	320 g	320 g
Boleado-Reposo				
Tiempo de finalización del amasado-principio del amasado	25 min	50 min	25 min	25 min
Amasado Amasadora US				
Fermentación final Estufa Forma	35°C  90% HRE	35°C  90% HRE	35°C  90% HRE	35°C  90% HRE
Cocción Horno Reed	21 min  190°C	21 min  190°C	21 min  190°C	21 min  190°C

Detalle del modo operatorio:

El protocolo de ensayo aplicado a las diferentes recetas anteriores en los ensayos PT1 a PT4 es el siguiente:

1. Se pesan los diferentes ingredientes.
- 5 2. Se miden la temperatura ambiente y la temperatura de la harina.
3. Se regula la temperatura del agua de forma que se obtenga una temperatura de masa, a +/-0,5°C, de 27°C para las recetas 1 y 4; 28°C para la receta 2 y 29°C para la receta 3.
4. Se ponen los ingredientes en una estufa Mac Duffy® de una amasadora Hobart A200®, cuya doble camisa se termostatiza previamente con agua a 22,5°C (recetas 1 y 4) ó 23,5°C (receta 2) ó 24,5°C (receta 3).
- 10 5. Se mezclar los ingredientes secos en primera velocidad durante 1 minuto.
6. El diagrama de amasado depende la receta empleada:
  - recetas 1 y 4:
    - se incorpora la materia grasa después de premezcla en seco,
    - se añade el agua de colado,
    - 15 - mezcla durante 5 minutos en primera velocidad (L5),
    - reposo durante 5 minutos (R5), y
    - amasado durante 4 minutos en segunda velocidad (H4),
  - receta 2:
    - se añade el agua de colado después de la premezcla en seco,
    - 20 - mezcla durante 1 minuto en primera velocidad (L1),
    - reposo durante 1 minuto para la adición de la materia grasa (+MG1),
    - mezcla durante 1 minuto en primera velocidad (L1), y
    - amasado durante 4 minutos en segunda velocidad (H4),
  - receta 3:
    - 25 - se añade el agua de colado después de la premezcla en seco,

- mezcla durante 1 minuto en primera velocidad (L1),
  - reposo durante 1 minuto para la adición de la materia grasa (+MG1),
  - mezcla durante 1 minuto en primera velocidad (L1), y
  - amasado durante 5 minutos 30 segundos en segunda velocidad (H5.5)
- 5 7. Se verifica la temperatura de la masa obtenida al final de amasado,
8. Fermentación en masa de la masa a 23°C durante 10 minutos (recetas 1, 3 y 4) ó 15 minutos (receta 2),
9. División en trozos de masa de 320 g,
10. Se comprime poco apretado y se cubre,
11. Se dejar reposar durante 10 minutos (recetas 1, 3 y 4) ó 30 minutos (receta 2),
- 10 12. Elaboración de la masa,
13. Se ponen en moldes los trozos de masa de 320 g (dimensiones: base del molde de 185x75 mm; altura del molde de 200x90 mm; altura del molde de 75 mm),
14. Determinación del tiempo de fermentación final, denominado *proof time*, en una incubadora Stéricult® a 35°C y 90% de humedad relativa. El *proof time* es el tiempo entre la colocación en moldes en la incubadora y el momento en que la masa alcanza una altura de 85 mm en el molde, y
- 15 15. Cocción en un horno de carga basculante REED® durante 21 minutos a 190°C.

**Ejemplo 3.2.: Resultados**

Tabla 1: Ensayos en el fermentómetro. Desviación del híbrido según la invención frente al precursor I-4341.

Biomasa producida en matraz, evaluación sobre levadura fresca

Ensayo	Precursor 1	Precursor 2	I-4312	I-4313
	I-4341	I-4448	Sin adaptación	Sin adaptación
	Sin adaptación	Sin adaptación		
A5	122	120	137	132
A5'	92	98	114	115
Ganancia/precursor			17 y 24%	18 y 24%

20

Biomasa producida en fermentador de 7 L, evaluación sobre levadura fresca

Ensayo	I-4341	I-4341	I-4312	I-4313
	Sin adaptación	Con adaptación	Sin adaptación	Sin adaptación
A5	96	99	121	126
A5'	79	108	114	107
A61	139	179	209	225
A61'	88	105	121	131

Biomasa producida en fermentador de 20 L, evaluación sobre levadura fresca

25

Ensayo	I-4341	I-4341	I-4312	I-4313
	Sin adaptación	Con adaptación	Sin adaptación	Sin adaptación
A5	102	105	105	97
A5'	99	107	90	80
A51	159	214	173	209
A51'	124	160	107	134
A61	167	232	169	241
A61'	95	114	97	125

Tabla 2: Ensayo en *No-Time Dough* del híbrido según la invención frente a la levadura obtenida a partir de la cepa no adaptada registrada el 8 de julio de 2010 en la CNCM con el N° I-4342.

Biomasa producida en fermentador 20 L, evaluación sobre levadura fresca

Ensayo	I-4342	I-4313
	Sin adaptación	Sin adaptación
PT1	T	-14%
PT2	T	-9%
PT3	T	-17%

5

Tabla 3: *No-Time Dough* de los híbridos según la invención frente a testigo adaptado (= I-4341 adaptada)

Biomasa producida en fermentador de 20 L, evaluación sobre levadura fresca

Ensayo	I-4341	I-4313
	Con adaptación	Sin adaptación
PT2	T	1%
PT3	T	-5%
PT4	T	3%

10

Conclusión: las levaduras no adaptadas según la invención se comportan de forma sensiblemente idéntica incluso mejor por comparación con una levadura testigo no adaptada, producida por cruce de una de las mejores cepas osmotolerantes disponibles en la colección interna de la Solicitante y registrada con el número I-4341 y una cepa comercial poco sensible a los ácidos débiles.

Estos resultados son sorprendentes ya que no era en absoluto previsible acumular las ventajas preexistentes de los dos precursores hibridando cepas industriales, sobre todo sobrepasando de 15% a 25% los valores de desprendimiento gaseoso de sus dos precursores.

15

La presente invención proporciona así híbridos aptos para producir levaduras de panificación a menor coste a la vez que son igualmente eficaces en masas panaderas muy azucaradas y en presencia de inhibidores de mohos como el propionato de calcio.

**EJEMPLO 4: Preparación de los mutantes I-4409 e I-4410**

20

La cepa I-4341 se ha sometido a una mutagénesis por exposición a radiación ultravioleta. Se ha evaluado una población de mutantes en los ensayos A5 y A5' después de producción en matraz. Las cepas I-4409 e I-4410 han sido seleccionadas al inicio de esta población.

**EJEMPLO 5: Preparación de la levadura a partir de los mutantes del Ejemplo 4 (ídem ejemplo 2)**

**EJEMPLO 6: Comparación de las prestaciones con una levadura testigo**

## ES 2 669 569 T3

Biomasa producida en matraz, evaluación sobre levadura fresca

<b>Ensayo</b>	<b>I-4341 Sin adaptación</b>	<b>I-4409 Sin adaptación</b>	<b>I-4410 Sin adaptación</b>
A5	121	117	126
A5''	88	105	96
Ganancia/I-4341 en A5'' (%)		19	9

Biomasa producida en fermentador de 20 L, evaluación sobre levadura seca

<b>Ensayo</b>	<b>I-4341 Con adaptación</b>	<b>I-4409 Sin adaptación</b>	<b>Desviación (%)</b>
A5	101	101	0
A5'	104	100	-4
A51	104	114	10
A51'	136	159	17

<b>Ensayo</b>	<b>I-4341 Con adaptación</b>	<b>I-4410 Sin adaptación</b>	<b>Desviación (%)</b>
A5	96	106	10
A5'	101	97	-4

Los resultados de panificación obtenidos con estas levaduras son los siguientes (ensayos PT2 y PT3)

<b>Ensayo</b>	<b>I-4341 Con adaptación</b>	<b>I-4410 Sin adaptación</b>	<b>I-4410 Con adaptación</b>
PT2	T	2%	-11%
PT3	T	2%	-4%

<b>Ensayo</b>	<b>I-4341 Con Adaptación</b>	<b>I-4409 Sin adaptación</b>
PT1	T	3%
PT2	T	5%
PT3	T	-1%

## REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* susceptible de ser obtenida:

5 - mediante un procedimiento de hibridación que comprende la hibridación de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada en la CNCM el 8 de julio de 2010 con el número I-4341 con la cepa registrada en la CNCM el 9 de febrero de 2011 con el número I-4448, y al menos una etapa de selección del híbrido obtenido elegido en el grupo formado por:

10 i una actividad fermentativa, medida con un fermentómetro de Burrows y Harrison en el ensayo A5' o en los ensayos A5 y A5", siendo el híbrido seleccionado tal que su desprendimiento gaseoso es superior al menos en 10% y preferentemente de 15 a 25% al de una cepa testigo que consiste en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341,

15 ii un tiempo de fermentación final en el procedimiento *No-time Dough* sobre masa que contiene 15%, 18%, 23% o 25% de azúcar (porcentajes del panadero) en presencia de 0,4% de propionato de calcio, siendo los híbridos seleccionados aptos para producir levaduras de panificación por multiplicación, en ausencia de adaptación al propionato de calcio, que proporcionan un tiempo de fermentación final comprendido entre 85% y 105% y preferentemente entre 95% y 105% del tiempo de fermentación final proporcionado por una levadura de panificación testigo producida a partir de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341 por multiplicación con adaptación de ésta a la presencia de propionato de calcio,

o,

20 - mediante un procedimiento de mutación aleatoria de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341, y al menos una etapa de selección del mutante obtenido elegido entre el grupo formado por:

25 i una actividad fermentativa, medida con el fermentómetro de Burrows y Harrison en el ensayo A5", siendo el mutante seleccionado tal que su desprendimiento gaseoso es superior de 5 a 20% al de una cepa testigo que consiste en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341,

30 ii un tiempo de fermentación final en el procedimiento *No-Time Dough* sobre masa que contiene 15%, 18%, 23% o 25% de azúcar (porcentajes del panadero) en presencia de 0,4% de propionato de calcio, siendo el mutante seleccionado apto para producir levaduras de panificación por multiplicación, en ausencia de adaptación al propionato de calcio, que proporcionan un tiempo de fermentación final comprendido entre 90% y 105% del proporcionado por una levadura de panificación testigo producida a partir de la cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* registrada el 8 de julio de 2010 ante la CNCM con el número I-4341 por multiplicación con adaptación de ésta a la presencia de propionato de calcio,

35 caracterizada por que dicha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es apta para producir, por multiplicación en ausencia de adaptación a la presencia de ácido(s) débil(es), una levadura de panificación que presenta una osmotolerancia y una resistencia intrínseca a los ácidos orgánicos débiles.

2. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1, registrada el 11 de mayo de 2010 ante la CNCM con el número I-4312.

40 3. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1, registrada el 11 de mayo de 2010 ante la CNCM con el número I-4313.

4. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1, registrada ante la CNCM con el número I-4409.

5. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación 1, registrada ante la CNCM con el número I-4410.

45 6. Levadura de panificación susceptible ser obtenida por multiplicación sin adaptación a la presencia de ácido(s) débil(es) de una cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 u obtenida por el procedimiento definido en la reivindicación 1.

7. Masa panadera que contiene una levadura de panificación según la reivindicación 6.

50 8. Masa panadera según la reivindicación 7, caracterizada por que se elige entre las masas en las que la fermentación se realiza en presencia a la vez de una presión osmótica debida a la presencia de al menos 15% de azúcar, preferentemente al menos 18% de azúcar, preferentemente todavía al menos 23% de azúcar y en presencia de un inhibidor de mohos de tipo ácido orgánico débil, preferentemente en forma de propionato de calcio, siendo los porcentajes, porcentajes del panadero.

9. Procedimiento de preparación de un producto cocido de panificación por realización de una masa panadera según la reivindicación 7 o la reivindicación 8.

10. Producto de panificación susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la reivindicación 9.