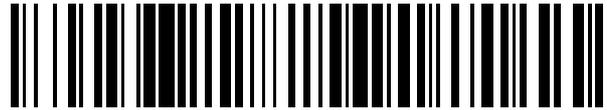


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 201**

21 Número de solicitud: 201731116

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)
C12G 1/022 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.09.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.03.2019

71 Solicitantes:

TOMSA DESTIL, S.L. (100.0%)
C/ Bahía de Pollensa 21
28042 Madrid ES

72 Inventor/es:

VILLENA REYES, Miguel;
AGUADO RAMOS, Manuel;
NÚÑEZ GUTIÉRREZ, Yolanda;
MAGANTO BURGOS, Elena y
HERNÁNDEZ MATEO, Daniel

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y su uso para la elaboración de productos alcohólicos**

57 Resumen:

Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y su uso para la elaboración de productos alcohólicos.

La presente invención se refiere a una nueva cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, osmoetanoltolerante, y a su uso para producir etanol o elaborar productos alcohólicos. Asimismo, la cepa descrita tiene utilidad para la producción de biomasa.

ES 2 704 201 A1

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y su uso para la elaboración de productos alcohólicos

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo técnico de las fermentaciones alcohólicas, tales como elaboración de vinos, cerveza, alcohol, etc, para consumo humano. Más concretamente, la presente invención se refiere a una nueva cepa de levadura de la especie
10 *Saccharomyces cerevisiae*, osmoetanoltolerante, y a su uso para producir etanol o elaborar productos alcohólicos. Asimismo, la cepa descrita tiene utilidad para la producción de biomasa.

Antecedentes de la invención

15

El estrés osmótico tiene una notable influencia sobre la fisiología celular de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, que se manifiesta en la dinámica de cambios de la pared celular, en la alteración de la homeostasis de iones, en ajustes metabólicos, en la detención de ciclo celular, así como un efecto muy notable sobre la expresión génica. Por tanto, el estrés
20 osmótico es un factor que afecta negativamente tanto a la proliferación celular como a la capacidad fermentadora de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y en última instancia a la producción de alcohol a nivel industrial.

Existe por tanto una necesidad constante de desarrollar nuevas cepas de *Saccharomyces*
25 *cerevisiae* que presenten características mejoradas y en particular que presenten una alta osmoetanoltolerancia.

Algunas cepas de *S. cerevisiae* con características mejoradas ya se han descrito en la literatura como por ejemplo en ES2116922, ES2524704 o ES2406412.

30

Los autores de la presente invención han obtenido una nueva cepa híbrida de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* mediante la técnica de fusión de protoplastos a partir de la cepa altamente osmotolerante *S. cerevisiae* NCYC73 y de otra cepa *S. cerevisiae*. Mediante esta técnica se produce un intercambio cromosómico sobre todo de cromosomas
35 de menor peso molecular, que da como resultado una nueva cepa de levadura en la que coexisten características y capacidades de ambas cepas parentales.

De manera particular, la cepa obtenida por los autores presenta una alta capacidad osmoetanoltolerante y una capacidad para producir 16° G.L o superiores.

Breve descripción de la invención

5

El aspecto principal de la invención es una cepa osmoetanoltolerante de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, (cepa de la invención), que fue depositada el 4 de julio de 2017 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Burjassot, Valencia, España) y a la cual se le asignó el número de acceso CECT 13152.

10

En otro aspecto relevante, la invención se refiere al uso de la cepa de la invención para la producción de etanol o de productos alcohólicos por fermentación empleando diferentes sustratos.

15

Asimismo, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la levadura para la producción de biomasa.

20

Un último aspecto de la invención se refiere a una composición microbiológica que comprende una cepa de la invención y opcionalmente al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes o de productos alcohólicos.

Breve descripción de las figuras

25

Figura 1: muestra un esquema de la eliminación de la pared celular en las cepas de levadura parentales.

30

Figura 2: representación de la fusión de los protoplastos de las células parentales, siendo el protoplasto A una levadura altamente osmotolerante y el protoplasto B una levadura empleada en fermentación industrial.

35

Figura 3: se muestra un esquema de la producción de la cepa de la invención por la técnica de fusión de protoplastos que implica la secuencia del tratamiento con enzimas líticas de las levaduras parentales, inducción de la fusión de protoplastos, incubación de nuevos híbridos y selección en medios específicos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en su aspecto principal a una cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 13152.

Esta cepa presenta como principal característica que es altamente osmoetanoltolerante lo cual, la hace especialmente adecuada para la producción de etanol por fermentación alcohólica a partir de diferentes sustratos, así como para la elaboración de productos alcohólicos tales como bebidas alcohólicas (vino, cerveza, cava o sidra). De hecho la cepa de la presente invención es capaz de producir etanol o productos alcohólicos mediante fermentación a 16 ° G.L. o superiores.

La cepa de la invención se ha obtenido por la técnica de fusión de protoplastos que permite el intercambio genético de las células parentales mediante una etapa previa de digestión de sus paredes celulares y una posterior de fusión de membranas. Las figuras 1 y 2 muestran una representación gráfica de ambas etapas.

Por tanto la cepa de la invención es una cepa híbrida resultante de la fusión de una cepa altamente osmotolerante de *S.cerevisiae*, la cepa NCYC73 y otra cepa de *S.cerevisiae* empleada en fermentación industrial. La cepa obtenida posee características y capacidades de ambas cepas parentales y de manera particular muestra una alta osmoetanoltolerancia.

La cepa de la invención puede ser transportada en formato líquido, fresco en pasta, seco activo o seco instantáneo.

La cepa de la invención presenta una morfología ovoide y un color beige mate. Las características metabólicas observadas son similares a las de otras cepas industriales de *S. cerevisiae* y en particular de las cepas parentales de las que proviene. El rápido crecimiento y la rápida metabolización de los azúcares fermentables, así como la alta osmoetanoltolerancia de la cepa de la invención la hacen especialmente adecuada para su uso industrial y de manera particular en la producción de bioetanol o en la producción de bebidas alcohólicas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso o aplicación de la cepa de la invención. Por un lado, la cepa de la invención es de utilidad en la producción de etanol o la elaboración

productos alcohólicos por fermentación.

En una realización particular, la cepa de la invención es útil para la producción de bioetanol a partir de residuos vegetales y residuos lignocelulósicos. Los residuos vegetales o residuos
5 lignocelulósicos pueden ser la fracción biodegradable de los productos, residuos y restos de origen procedentes de la agricultura tales como residuos de cultivos, ricos en azúcares fermentables, como caña de azúcar; biomasa de almidón, por ejemplo, granos o paja de trigo; o maíz o paja de maíz o grano de maíz o fibra de maíz; o granos o paja de cebada; o granos o paja de sorgo, arroz, hierba, ramas, etc. Los residuos vegetales y residuos
10 lignocelulósicos también pueden provenir de industrias forestales tales como la maderera.

En cuanto a la aplicación para la producción de productos alcohólicos por fermentación la cepa de la invención es especialmente adecuada para la elaboración de bebidas alcohólicas y de manera más particular de bebidas como el vino, la cerveza, el cava, la sidra o bebidas
15 destiladas.

El uso de la cepa de la invención permite obtener por fermentación alcohólica etanol o productos alcohólicos a 16 ° G.L. o superiores.

20 Asimismo, otro de los usos de la cepa de la invención es para la panificación o producción de pan o productos de repostería y pastelería.

Otro de los usos de la cepa de la invención es para la producción de biomasa como medio
25 para transformar residuos vegetales o animales (lactosueros) fermentables de bajo valor añadido en biomasa con un alto valor proteico.

En una realización particular, la biomasa obtenida tiene aplicación como fuente de alimentación animal, en particular de ganado.

30

Un último aspecto de la invención se refiere a una composición microbiológica que comprende la cepa de la invención y, opcionalmente, al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes o de productos alcohólicos y/o el proceso de fermentación.

35 En una realización particular de la invención la composición se puede presentar en formato de composición acuosa diluida, crema, prensada, seca o liofilizada.

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1: Obtención del mutante *Saccharomyces cerevisiae* de la invención (CECT 13152).**

Para la obtención de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 13152 se utilizaron métodos de fusión de protoplastos análogos a los descritos en “*Induced Fusion of Fungal Protoplasts following Treatment with Polyethylene Glycol*”. Journal of General Microbiology 10 (1976), 92, 4 | 3- 4 | 7. J. Anne and J. F. Peberdy o “*Fusion of protoplasts of Bacillus megaterium.*” Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 73, No. 6, pp. 2147-2150, June 1976 Microbiology. Katalin Fodor and Lajos Alfoldi.

15 A continuación se detallan los pasos que se llevaron a cabo para la obtención del mutante depositado con el número CECT 13152.

Crecimiento de las cepas parentales

Las cepas parentales se hicieron crecer en placas de agar glicerol, para asegurarse de que respiraban correctamente. Como cepas parentales se utilizaron, por un lado, la cepa NCYC73 de *S.cerevisiae* con una capacidad altamente osmotolerante y por otro lado, otras 20 cepas de *S.cerevisiae* de uso industrial.

Una vez crecidas en estas placas, se inocularon 1, 2 ó 3 asas de estas levaduras en un medio líquido, cuya composición dependió de la condición de osmotolerancia de la levadura.

Las levaduras osmotolerantes, en un medio que contiene glucosa, producen una pared más dura, que cuesta más degradar en la fase de lisis. Por ello se usó galactosa, de modo que la 25 pared resultante quedó más laxa. Una vez inoculados los medios, se mantuvieron entre 25° y 35°C y entre 50 y 500 rpm, durante una noche.

El tiempo de incubación depende de la curva de crecimiento de la levadura, de manera que se retiraron del shaker cuando finalizaban la fase exponencial y antes de entrar en la fase estacionaria.

Resuspensión de las levaduras en buffer de pretratamiento.

Para la fusión, lo primero que hay que hacer es obtener un pellet de crema de levadura. Para ello, se tomaron entre 10 y 50 ml del medio de cultivo, y se centrifugó entre 500 y 5000 rpm durante 1 y 10 minutos y luego se retiró el sobrenadante hasta dejar entre 1 y 12 ml. Se resuspendió y centrifugó de nuevo entre 1000 y 5000 rpm durante 1 y 10 minutos.

Preparación del buffer de pretratamiento.

Al buffer de pretratamiento Tris-EDTA pH entre 6 y 9 previamente preparado y autoclavado, se le añadió β -mercaptoetanol en la siguiente proporción: entre 4 y 11 ml de buffer Tris-EDTA + 100 - 400 μ l de β -mercaptoetanol, agitando bien. El β -mercaptoetanol se incorporó a un falcon de 15ml conteniendo entre los 4 y 11 ml de buffer. El buffer tenía la molaridad adecuada para la condición de osmotolerancia de la levadura que estemos utilizando. Por norma general, si no eran osmotolerantes, se utilizó un buffer con sorbitol entre 0,2 y 1 M o KCl entre 0,2 y 1 M. Por el contrario para las osmotolerantes se usó el buffer con una molaridad entre 0,1 y 1,1 M con sorbitol o entre 0,5 y 2 M con KCl.

15 Pretratamiento de las levaduras

Se retiró el sobrenadante de las levaduras tras la última centrifugación. Se incorporó entre los 4 y 12 ml de buffer de pretratamiento ya conteniendo el β -mercaptoetanol. Se agitó bien, valiéndose de un vórtex y se introdujo la mezcla en el shaker entre 30° y 45°C y entre 50 y 200 rpm durante 10 y 50 minutos. Se mantuvo entre 5 y 15 minutos adicionales a las revoluciones indicadas anteriormente. Se volvió a centrifugar entre 1000 y 5000 rpm durante 1 y 20 minutos. A este nivel la pared ya empezaba a degradarse.

Preparación del buffer de lisis

Para preparar el buffer de lisis a un buffer fosfato-citrato (con sorbitol) pH entre 4 y 7 se le incorporaron las enzimas líticas.

25 Justo antes de incorporar el buffer de lisis sobre las levaduras, se filtró con un filtro estéril de entre 0,1 y 1 μ m. se usaron entre uno o dos filtros para filtrar completamente entre 1 y 10 ml de buffer.

Finalización de la lisis de la pared celular

Se retiró casi todo el sobrenadante del falcon, y se adicionaron entre 1 y 10 ml del buffer de lisis estéril. Luego se resuspendieron las levaduras. Se incubó la mezcla entre 30° y 40°C nuevamente y a una agitación de entre 50 y 500 rpm durante 10 a 50 minutos. Entre los 10 y 50 minutos se empezó a comprobar la aparición de los esferoplastos en la suspensión.

Para determinar en qué momento la lisis se había completado se realizó prueba del agua se basa en la fragilidad que poseen las células sin pared ante variaciones osmóticas en el medio extracelular. Para llevarla a cabo, se introdujeron entre 5 y 75 µl de la solución de levaduras en 0,5 y 6 ml de agua miliQ. Cuando la solución quedaba translúcida significaba que las levaduras aún no han perdido la pared mientras que cuando la solución quedaba transparente, con pequeños grumos blanquecinos implicaba que las levaduras habían perdido su pared, y al introducirlas en un medio hipotónico, no resistían el cambio.

Si hemos elegido de manera incorrecta la molaridad del buffer, puede ser que las células no pierdan la pared correctamente, que sufran una modificación en su forma, o en su tamaño (por pérdida o absorción de agua). En estos casos, las levaduras no pueden utilizarse para la fusión. Las levaduras osmotolerantes tardan más tiempo en lisar su pared celular.

Mientras la solución permanecía translúcida, las levaduras se introducían de nuevo en el shaker y se repetía la prueba pasados entre 10 y 60 minutos. Así hasta que las células se rompían en agua. Para comparar la respuesta de las levaduras en agua con un control negativo, se introdujeron entre 5 y 80 µl de levaduras en 0,5 y 6 ml de buffer.

También se comprobó visualmente la formación de los esferoplastos por observación al microscopio.

Lavado de las células y medida de la población celular

Una vez se formaron los esferoplastos, se procedió al lavado de las células para su fusión. Para ello se empleó buffer de lavado Tris-HCl pH entre 6 y 9 con sorbitol (a la molaridad a la que correspondiera). Así, una vez retirado el falcon del shaker, se añadió entre 1 y 15 ml del buffer de lavado y agitando, se centrifugó entre 500 y 5000 rpm durante 1 y 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se repitió el procedimiento. Este procedimiento se realizó en total entre una y seis veces.

La última vez, tras retirar el sobrenadante se añadieron entre 1 y 6 ml del buffer de lavado y se resuspendió cuidadosamente. Seguidamente se tomaron entre 1 y 20 μ l de la suspensión de levaduras y se disolvieron entre 450 y 1000 μ l de agua miliQ. De esa dilución se tomó con una pipeta una pequeña cantidad y se introdujo en la cámara de Neubauer (objetivo de 40X). Se contaron los millones de células, y en función de la población, se determinaron los ml que había que añadir de la suspensión para recoger entre 100 y 2000 millones de células. Lo importante era que hubiera la misma cantidad de las dos cepas de levadura para fusionar.

Incubación de las levaduras en la solución de fusión

Se introdujo en un eppendorf la cantidad de suspensión de esferoplastos de la primera levadura que se calculó en función de la población. A continuación, se centrifugó entre 1000 y 7000 rpm durante 1 y 50 segundos. Una vez hecho esto, se retiró el sobrenadante y se incorporó la cantidad de suspensión de la segunda levadura. Se centrifugó nuevamente entre 1000 y 7000 rpm el mismo tiempo. Se retiró el sobrenadante de nuevo y se incorporó entre 0,1 y 5 ml de la solución de fusión. El PEG hace muy densa la solución y resulta difícil aspirarla. Se resuspendió y se incubó en una estufa entre 27 y 40°C durante 10 y 50 minutos.

Crecimiento de híbridos en medio sólido

Una vez pasados entre los 10 y 50 minutos de fusión, se tomaron entre 10 y 75 ml de una solución de agar tipo E al 1,5% autoclavado y atemperado entre 40 y 70°C y entre 10 y 65 ml de CaCl₂ entre 0,5 y 2M esterilizado con filtro de entre 0,1 y 0,5 μ m y también atemperado entre 40 y 70°C y se mezcló bien. A la mezcla se le añadieron entre 50 y 300 μ l de la solución de fusión con las levaduras, y se agitó para dispersar los híbridos por todo el agar.

Por último, se vertió esta mezcla sobre las placas OSY que se incubaron entre 20 y 40°C durante 1 a 5 días.

Fases posteriores.

Las colonias que crecidas en el medio OSY, se tomaron y se sembraron en medio YPD, y de ahí se pasaron a agar glicerol entre 1 y 5%. En el medio YPD se sembraron tomando todas las colonias grandes, formando 4 ó 5 estrías sobre la placa. Desde el agar glicerol se preparó un tubo de reserva utilizando medio glicerol entre 10 y 50%.

De entre las diferentes cepas aisladas se seleccionó la cepa de la invención depositada con el número de acceso CECT 13152.

Ejemplo 2: Cinética de crecimiento del mutante *Saccharomyces cerevisiae* CECT 13152.

5 Para estudiar la cinética de crecimiento se inocularon muestras las cepas tanto parentales como la nueva cepa mutante CECT 13152 en caldo YPD. Se realizó un balance de materia en base a los requerimientos nutricionales de la levadura formulando tres medios, a base de residuos agroindustriales, tubérculos, hidrolizados de cereal y desechos de frutas. Se reguló el pH de las muestras hasta llegar al rango de 4.5-5.0. Luego del mezclado y homogenizado,
10 se autoclavaron los medios a 121°C por 15 minutos.

Los medios de cultivo se pusieron en balones de vidrio de 2L de capacidad; se conectó el mecanismo de aireación a este sistema a través de bombas de baja potencia junto a piedras difusoras, éstas fueron desinfectadas e introducidas en los medios de cultivo respectivos. Finalmente se procedió a inocular las levaduras cosechadas. Los sistemas fueron cubiertos
15 con algodón para evitar contaminación externa.

Se realizaron mediciones cada hora, para lo cual se tomó una muestra de 10 mL de cada cultivo. El crecimiento fue cuantificado empleando la cámara de Neubauer con un microscopio óptico con aumento de 400X; durante la producción de biomasa se controlaron el °Brix y pH. Se usaron las versiones modificadas de los modelos Logístico y de Gompertz
20 propuestas por Zwietering et al., (1990).

Lo que permitió determinar la cinética de crecimiento a través del crecimiento máximo (Y_{max}), fase lag o de adaptación (λ), velocidad específica de crecimiento (μ_{max}). Se calculó el tiempo de generación (G): $G = \log 2 / \mu_{max}$.

Los resultados demostraron que el tiempo de generación de *Saccharomyces cerevisiae*
25 CECT 13152 respecto de ambas cepas parentales aumentó en al menos un 20%, sin incremento de la duración del período de latencia.

Ejemplo 3: Valoración in vitro de la capacidad de producción de etanol y osmotolerancia del mutante *Saccharomyces cerevisiae* CECT 13152.

Se llevó a cabo un ensayo comparativo entre la capacidad de producción de alcohol entre una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa CECT 13152 en diferentes condiciones y diferentes sustratos.

En la siguiente tabla 1 se resume las condiciones y parámetros que se midieron antes y después del ensayo de fermentación usando azúcar moreno como fuente de carbono:

TABLA 1

| CÓDIGO | PARÁMETROS INICIALES | | | | | | | PARÁMETROS FINALES | | | | | | |
|--------|------------------------------|------------|-------|-------------------------------|---------------------|------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------|------------------------|---------------------|------|------------------------|
| | AZÚCARES INICIALES (g/100mL) | LEV | BUFER | DENSIDAD (g/cm ³) | POBLACIÓN (mill/mL) | PH | ACIDEZ (% ác. acético) | °GL DESTILADO | HORAS FERMENTACIÓN | AZÚCARES (%) | ρ (g/cm ³) | POBLACIÓN (mill/mL) | PH | ACIDEZ (% ác. Acético) |
| 1 | 20 | Comercial | NO | 1,080 | 73 | 4,40 | <0,01 | 5,8 | 90 | 11,5 | 1,036 | 106 | 2,9 | 0,25 |
| 2 | 17 | | | 1,070 | 80 | 4,34 | <0,01 | 5,6 | 90 | 8,48 | 1,025 | 133 | 3,3 | 0,21 |
| 3 | 20 | CECT 13152 | | 1,080 | 75 | 4,40 | <0,01 | 7,2 | 72 | 8,15 | 1,024 | 111 | 3,16 | 0,25 |
| 4 | 17 | | | 1,070 | 70 | 4,34 | <0,01 | 6,6 | 72 | - | 1,016 | 101 | 3,13 | 0,22 |
| 5 | 20 | Comercial | Sí | 1,086 | 90 | 4,48 | 0,33 | 7,9 | 90 | - | 1,025 | 155 | 3,81 | 0,59 |
| 6 | 17 | | | 1,075 | 145 | 4,51 | 0,34 | 7,7 | 90 | 4,69 | 1,016 | 161 | 3,75 | 0,60 |
| 7 | 20 | CECT 13152 | | 1,086 | 128 | 4,48 | 0,33 | 11,0 | 72 | - | 1,004 | 110 | 4,07 | 0,53 |
| 8 | 17 | | | 1,075 | 120 | 4,51 | 0,34 | 10,2 | 72 | 0,18 | 0,996 | 120 | 4,03 | 0,55 |
| | | | | | | | | | | | | | | |

10 Lo primero que se puede observar es que la cepa de la invención tiene una elevada osmotolerancia a los azúcares y que es capaz de crecer y metabolizar azúcares a una alta concentración de hasta por los menos 28 g/100ml.

15 Por otro lado, tal y como se puede observar el grado de alcohol destilado es sustancialmente mayor en el caso de la cepa CECT13152 que en el de la cepa comercial en todas las condiciones ensayadas, lo cual demuestra que la cepa es apropiada para su uso industrial.

En la tabla 2 también se resumen algunos de los parámetros que demuestran la mayor capacidad fermentativa y de producción de alcohol de la cepa de la invención:

Tabla 2

| CÓDIGO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | UNIDADES |
|---|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------------|
| η TEÓRICO | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | g EtOH/g glucosa |
| GRADO ALCOHÓLICO DESTILADO | 5.8 | 5.6 | 7.2 | 6.6 | 7.9 | 7.7 | 11 | 10.2 | °GL |
| | 45.80 | 44.22 | 56.85 | 52.11 | 62.38 | 60.80 | 86.86 | 80.54 | g EtOH puro/L |
| AZÚC FERMENT SOBRE ALCOHOL | 89.60 | 86.51 | 111.23 | 101.96 | 122.04 | 118.95 | 169.94 | 157.58 | g azúcares fermentables/L |
| AZÚCARES FERMENTABLES MEDIDOS HPLC | 200 | 170 | 200 | 170 | 200 | 170 | 200 | 170 | g/L |
| CONCENTRACIÓN SUSTRATO | 200 | 170 | 200 | 170 | 200 | 170 | 200 | 170 | g/L |
| % AZÚCARES FERMENTABLES EN EL SUSTRATO ORIGINAL (SIN DILUCIÓN) | | | | | | | | | |
| TEÓRICO (RESPECTO A °GL OBTENIDO) | 45 | 51 | 56 | 60 | 61 | 70 | 85 | 93 | % |
| REAL (RESPECTO A AZÚCARES MEDIDOS) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | % |
| η ETANOL MÁXIMO | 290 | 329 | 360 | 388 | 395 | 453 | 550 | 600 | L.A.P./ Tm sustrato |

De manera similar, se llevó a cabo un ensayo comparativo entre la capacidad de producción de alcohol entre una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa CECT 13152 para diferentes porcentajes de melaza como sustrato.

En las siguientes tablas 3A y 3B se detallan los códigos de los diferentes ensayos realizados que identifican tanto el porcentaje de melaza utilizado y los azúcares totales (código numérico) así como la cepa utilizada (código alfabético):

Tabla 3A y 3B

| Comercial | |
|-----------|--------------------------------------|
| 1A | 20% MELAZA (25% AZÚCARES TOTALES) |
| 2A | 20% MELAZA (20% AZÚCARES TOTALES) |
| 3A | 25% MELAZA (17,2% AZÚCARES TOTALES) |
| 4A | 25% MELAZA (25% AZÚCARES TOTALES) |
| 5A | 25% MELAZA (20% AZÚCARES TOTALES) |

| CECT 13152 | |
|------------|--------------------------------------|
| 1B | 20% MELAZA (25% AZÚCARES TOTALES) |
| 2B | 20% MELAZA (20% AZÚCARES TOTALES) |
| 3B | 25% MELAZA (17,2% AZÚCARES TOTALES) |
| 4B | 25% MELAZA (25% AZÚCARES TOTALES) |
| 5B | 25% MELAZA (20% AZÚCARES TOTALES) |

10

15

La tabla 4 resume a continuación los parámetros que se midieron antes y después del ensayo de fermentación usando melaza como fuente de carbono:

Tabla 4

| CÓDIGO | PARÁMETROS INICIALES | | | | | PARÁMETROS FINALES | | | | | | |
|--------|-----------------------------|---------------------|------|------|------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|------|------------------------|------|
| | ρ (g/cm ³) | POBLACIÓN (mill/mL) | BRIX | PH | ACIDEZ (% ác. acético) | °G.L. DESTILADO | HORAS FERMENTACIÓN | ρ (g/cm ³) | POBLACIÓN (mill/mL) | PH | ACIDEZ (% ác. acético) | BRIX |
| 1A | 1,134 | 141 | 32 | 4,45 | 0,56 | 13,0 | 120 | 1,036 | 188 | 4,64 | 0,72 | 17,6 |
| 1B | | 105 | | | | 15,1 | 76 | 1,025 | 118 | 4,61 | 0,74 | 17,4 |
| 2A | 1,110 | 101 | 27 | 4,53 | 0,53 | 10,4 | 120 | 1,027 | 170 | 4,43 | 0,82 | 14,4 |
| 2B | | 118 | | | | 12 | 42 | 1,020 | 183 | 4,60 | 0,77 | 14,0 |
| 3A | 1,108 | 116 | 26 | 4,46 | 0,71 | 9,5 | 120 | 1,036 | 191 | 4,60 | 0,89 | 15,8 |
| 3B | | 120 | | | | 9,7 | 50 | 1,040 | 200 | 4,61 | 0,92 | 15,4 |
| 4A | 1,138 | 71 | 33 | 4,45 | 0,70 | 3,8 | 126 | 1,109 | 123 | 4,49 | 0,88 | 28,6 |
| 4B | | 95 | | | | 9,2 | 91 | 1,067 | 176 | 4,45 | 0,93 | 22,0 |
| 5A | 1,120 | 114 | 29 | 4,43 | 0,73 | 10,2 | 128 | 1,036 | 166 | 4,61 | 1,00 | 16,4 |
| 5B | | 102 | | | | 12 | 67 | 1,030 | 165 | 4,55 | 0,91 | 15,2 |

- 5 En este caso se puede observar también que el grado de alcohol destilado es sustancialmente mayor en el caso de la cepa CECT 13152 que en el de la cepa comercial en todas las condiciones ensayadas.

La tabla 5 recoge algunos de los parámetros que demuestran la mayor capacidad fermentativa y de producción de alcohol de la cepa de la invención:

10

Tabla 5

| CÓDIGO | 1A | 1B | 2A | 2B | 3A | 3B | 4A | 4B | 5A | 5B | UNIDADES |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| η TEÓRICO | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | 0.511 | g EtOH/g glucosa |

ES 2 704 201 A1

| | | | | | | | | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|---------------------------|
| GRADO ALCOHÓLICO DESTILADO | 13 | 15.1 | 10.4 | 12 | 9.5 | 9.7 | 3.8 | 9.2 | 10.2 | 12 | °GL |
| | 102.65 | 119.23 | 82.12 | 94.75 | 75.01 | 76.59 | 30.00 | 72.64 | 80.54 | 94.75 | g EtOH puro/L |
| AZÚC FERMENT SOBRE ALCOHOL | 200.83 | 233.28 | 160.67 | 185.38 | 146.76 | 149.85 | 58.71 | 142.13 | 157.58 | 185.38 | g azúcares fermentables/L |
| AZÚCARES FERMENTABLES MEDIDOS HPLC | 250 | 250 | 200 | 200 | 172 | 172 | 250 | 250 | 200 | 200 | g/L |
| CONCENTRACIÓN SUSTRATO | 250 | 250 | 200 | 200 | 172 | 172 | 250 | 250 | 200 | 200 | g/L |
| % AZÚCARES FERMENTABLES EN EL SUSTRATO ORIGINAL (SIN DILUCIÓN) | | | | | | | | | | | |
| TEÓRICO (RESPECTO A °GL OBTENIDO) | 80 | 93 | 80 | 93 | 85 | 87 | 23 | 57 | 79 | 93 | % |
| REAL (RESPECTO A AZÚCARES MEDIDOS) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | % |
| η ETANOL MÁXIMO | 520 | 604 | 520 | 600 | 552 | 564 | 152 | 368 | 510 | 600 | L.A.P./ Tm sustrato |

Ejemplo 3: Capacidad fermentativa del mutante *Saccharomyces cerevisiae* CECT 13152.

Se determinó la capacidad fermentativa de nueva cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* CECT 13152 mediante fermentación a partir de sustratos amiláceos obtenidos a partir de tubérculos, hidrolizados de cereal y de desechos de frutas.

a) Hidrólisis del sustrato amiláceo

Como los azúcares presentes en los sustratos amiláceos utilizados se encuentran en forma de almidón y la levadura empleada carece de amilasas, fue necesario llevar a cabo la hidrólisis previa de los mismos. Además, se licuefactó el sustrato una vez se mezcló con el agua.

Mezcla de sustrato amiláceo-agua

Los sustratos amiláceos utilizados, esto es el cereal, los tuberculos y desechos de frutas fueron triturados y tamizados con un diámetro de aproximadamente 1mm y se mezclaron con agua a una proporción de 38:62 (sustrato: agua) (p/p).

Licuefacción en 2 etapas

5 Etapa 1. Se añadió un 20% de la dosis total de α -amilasa (Liquozyme, 240 KNU/g) a cada una de las mezcla y se incubó durante un periodo de 45 minutos a 65°C de temperatura en agitación constante, lo suficientemente intensa como para mantener el sustrato suspendido.

10 Etapa 2. Se añadió el 80% restante de la α -amilasa (Liquozyme, 240 KNU/g) a la mezcla y se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 85°C en agitación constante igual que en la etapa 1.

Autoclave

Los compuestos amiláceos procesados fueron introducidos en el autoclave y se sometieron a una temperatura de 130°C durante 3 minutos.

15 Sacarificación

Se agregó la dosis de amiloglucosidasa (Spirizyme Fuel) y se incubó a 65° C, durante 90 minutos manteniendo agitación constante, igual a la de etapas anteriores.

20 A partir de los distintos sustratos se realizaron diluciones, para obtener una concentración de azúcares del 27%.

Se adicionaron nutrientes a los medios de fermentación en los casos en los que fue necesario.

25 **b) Levadura y condiciones de propagación**

30 Se utilizó la levadura mutante *Saccharomyces cerevisiae* CECT 13152 para llevar a cabo la fermentación. Para ello se realizó una propagación previa a la fermentación. La propagación de levaduras se realizó en dos etapas: una etapa inicial en YPD y una segunda etapa en un sustrato azucarado de la misma naturaleza que el que se utilizó en fermentación, a una concentración de azúcares de entre 7-8%. La temperatura de propagación fue de 34.5°C, agitación de 120 rpm y pH de 5. Dependiendo del tipo de sustrato, fue necesaria la adición de sales y vitaminas. El empleo de aireación durante esta segunda etapa incrementó considerablemente el número de células obtenidas por mL al final del proceso.

c) Condiciones de fermentación

La fermentación se llevó a cabo a una temperatura constante de 35°C. En cuanto a la agitación, el ensayo se inició sin agitación, y se mantuvo así la primera hora. La segunda hora se programó a 40 rpm. Por último, se establecieron 85 rpm al comienzo de la tercera hora, y así se mantuvo hasta el final de la fermentación. Se definió el final de fermentación al momento en el que la pérdida de CO₂ entre dos medidas de peso consecutivas es cero, o cuando se superan las 100 horas de fermentación.

Los resultados de los ensayos de fermentación en los diferentes sustratos se muestran a continuación en las tablas 6 a 8.

Tabla 6. Azúcares iniciales (% p/v).

| Tubérculos | Hidrolizados de cereal | Desechos de frutas |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 27 | 27 | 27 |

Tabla 7. Concentración alcohólica obtenida (°G.L.)

| Tubérculos | Hidrolizados de cereal | Desechos de frutas |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 16,1° | 16,2° | 16,2° |

Tabla 8. Azúcares finales (% p/v).

| Tubérculos | Hidrolizados de cereal | Desechos de frutas |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 0,2 | < 0,1 | < 0,1 |

REIVINDICACIONES

1. Cepa de la especie *Saccharomyces cerevisiae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 13152.
5
2. Cepa según la reivindicación 1 caracterizada porque se encuentra en formato líquido, fresco en pasta, seco activo o seco instantáneo.
3. Uso de la cepa de la reivindicación 1 ó 2 en la producción de etanol o la elaboración
10 productos alcohólicos por fermentación.
4. Uso según la reivindicación 3 donde el etanol se produce por fermentación alcohólica de residuos vegetales y residuos lignocelulósicos.
- 15 5. Uso según la reivindicación 3 donde el producto alcohólico es una bebida alcohólica.
6. Uso según la reivindicación 5 donde la bebida alcohólica es vino, cerveza, cava, sidra o bebidas destiladas.
- 20 7. Uso según la reivindicación 3 donde la fermentación alcohólica produce etanol a 16 ° G.L. o superiores u otros productos alcohólicos.
8. Uso de la cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la panificación.
25
9. Uso de una cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la producción de biomasa.
10. Uso según la reivindicación 9 donde la biomasa tiene aplicación como fuente de
30 alimentación animal.
11. Composición microbiológica que comprende una cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 y opcionalmente al menos un elemento adicional que favorezca la producción de alcoholes o de productos alcohólicos y/o el proceso de fermentación.
35
12. Composición de acuerdo con la reivindicación 11 en formato de composición acuosa

diluida, crema, prensada, seca o liofilizada.

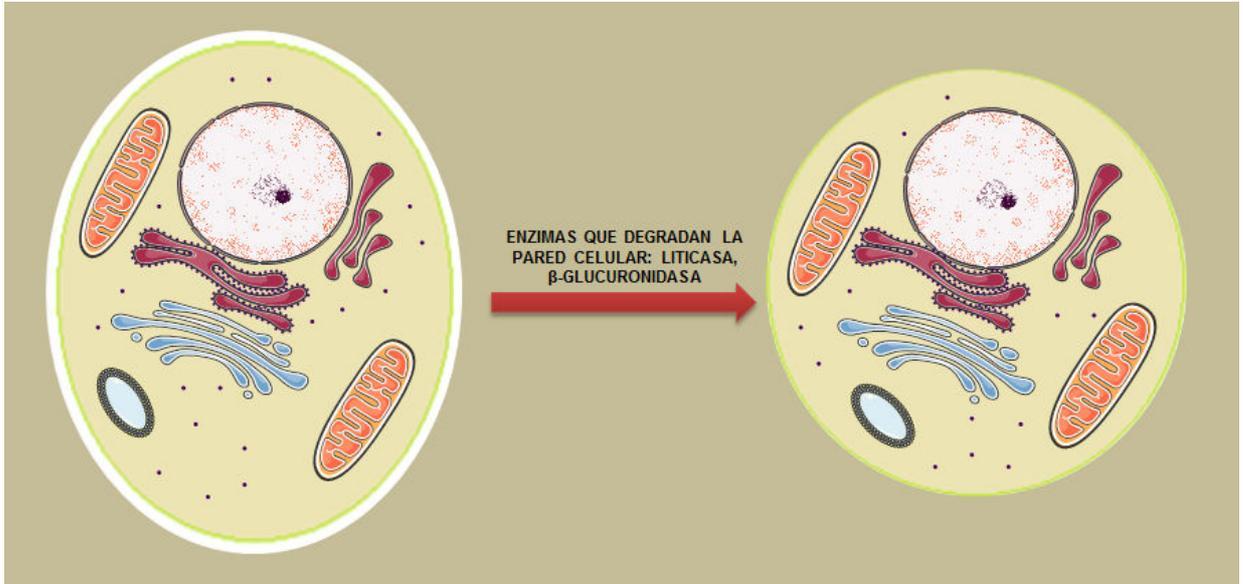


Fig. 1

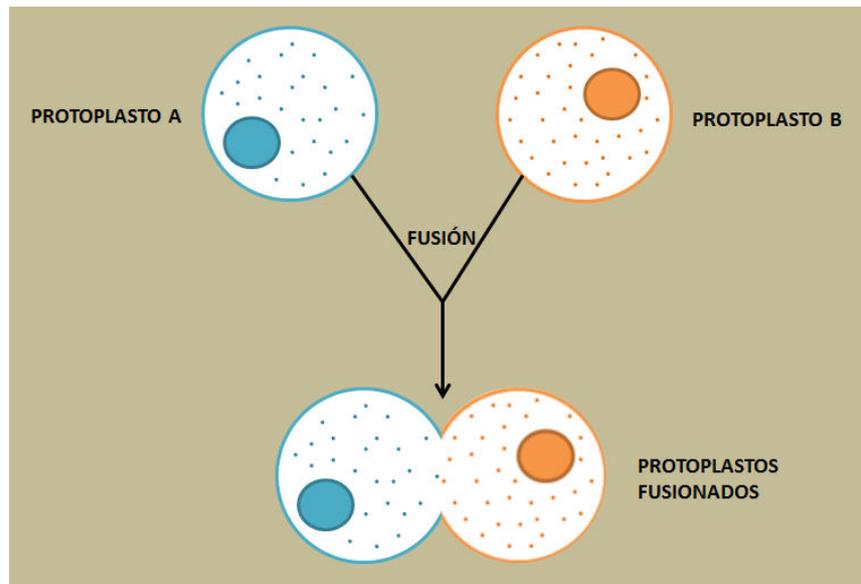


Fig. 2

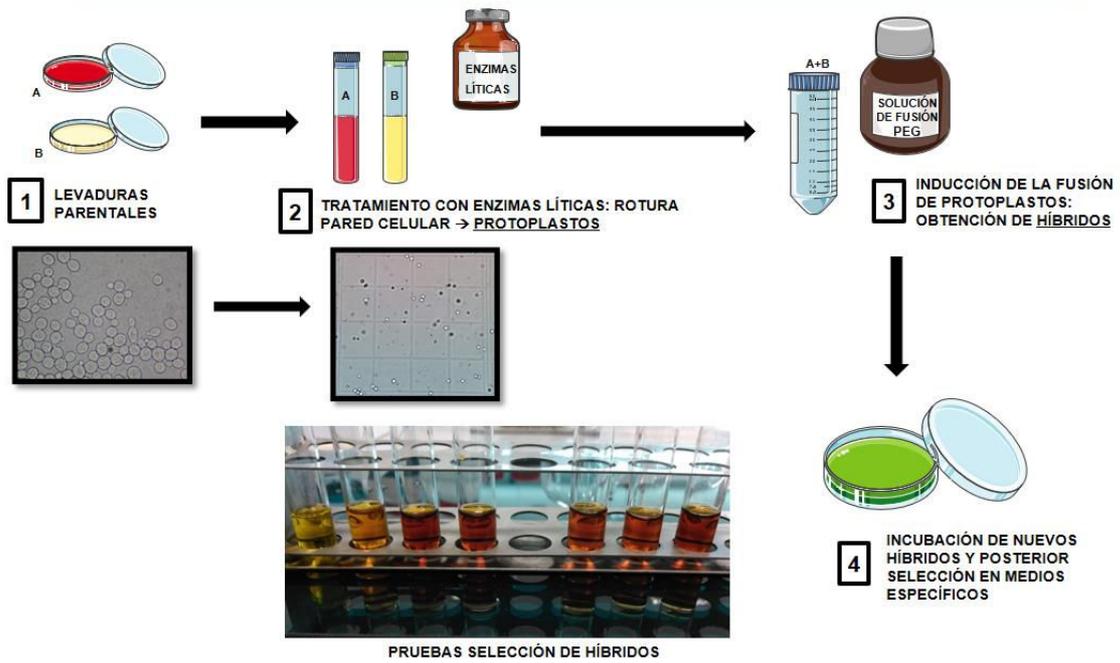


Fig.3



②① N.º solicitud: 201731116

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.09.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | SEKI, T. et al. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. <i>Biotechnology Letters</i> , 1983, vol. 5 (5), páginas 351-356, Página 355, figura 3. | 1-12 |
| X | ES 2350431 A1 (UNIV CORDOBA) 24/01/2011, Reivindicaciones, ejemplo 2. | 1-12 |
| X | ES 2350223 A1 (UNIV CORDOBA) 20/01/2011, Reivindicaciones, ejemplo 2. | 1-12 |
| X | BUESHER, W. A. et al. High alcohol wine production from grape juice concentrates. <i>AJEV</i> , 2001, vol. 52 (4), páginas 345-351, Tablas 2 y 3. | 1-12 |
| X | MALACRINO P. et al. The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains under high sugar stress. <i>Letters in Applied microbiology</i> , 2005, vol. 40, páginas 466-472, tabla 1. | 1-12 |
| X | BERTOLONI, M.C. et al. New strains for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. <i>Biotechnology Letters</i> , 1991, vol. 13 (3), páginas 197-702, table 1. | 1-12 |
| X | GUIJO, S. et al. Fermentative features of vinification and maturation yeasts isolated in the Montilla-Moriles region of Southern Spain. <i>Food Microbiology</i> , 1986, vol. 3, páginas 133-142, table 8. . | 1-12 |
| A | WO 0004190 A1 (MAXYGEN INC et al.) 27/01/2000, Página 71, página 80, línea 29-página 84, línea 15. | 1-12 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
19.04.2018

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/18 (2006.01)
C12G1/022 (2006.01)
C12P7/06 (2006.01)
C12R1/865 (2006.01)

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

C12N, C12G, C12P, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, FSTA