

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 054**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (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: **29.07.2015** **PCT/EP2015/067431**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016** **WO16016334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2015** **E 15775091 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** **EP 3194565**

54 Título: **Cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, cepas esencialmente derivadas de ella y uso de las mismas**

30 Prioridad:

29.07.2014 IT MI20141366

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

17.05.2019

73 Titular/es:

LA PIZZA + 1 S.P.A. (100.0%)
Via G. Galilei 11/13 Località Gariga
29027 Podenzano, IT

72 Inventor/es:

SANTE, LUDOVICO

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 713 054 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

Cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, cepas esencialmente derivadas de ella y uso de las mismas

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* aislada de una masa fermentada espontáneamente, que puede permanecer viable a temperaturas por debajo de 8 °C e inactiva para la producción de dióxido de carbono, y que es capaz de restablecer la capacidad de fermentación y leudación normal cuando se desplaza al intervalo de temperatura óptimo. Además, la invención se refiere a masas sólidas y fluidas, que comprenden al menos agua, harina y levadura según la invención, a los usos de tales masas y a su producción.

Estado de la técnica

[0002] La especie *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) Meyen ex E. C. Hansen (1883) es la especie del género *Saccharomyces*, representada por la cepa tipo *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171^T (Vaughan-Martini & Martini, 2011). Es una especie de levadura definida como domesticada, y su entorno ideal son los procesos industriales que involucran la fermentación de sustratos ricos en azúcar, tales como el mosto de la uva, la cerveza de malta y la masa de harina para panadería y confitería. Desde el punto de vista morfoológico, se caracteriza por células elipsoidales que en el estado asexual se reproducen por brotes multilaterales y rara vez forman pseudohifas posiblemente no septadas (Vaughan-Martini & Martini, 2011). Las cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* pueden ser haploides, aunque a menudo se encuentran en un estado diploide o ploidía superior. Las cepas aneuploides no son raras, incluso para las cepas de interés tecnológico con aplicaciones en enología, elaboración de cerveza y elaboración de pan (Legras y col., 2007). En su reproducción sexual, la conjugación tiene lugar entre células de diferentes tipos de apareamiento. Más comúnmente, las células con ploidía igual o mayor a dos se convierten directamente en asci. De hecho, los eventos de conjugación se consideran raros para la especie de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que se sabe que en ambientes naturales ocurre a muy baja concentración; aunque la concentración celular aumenta durante los procesos de fermentación realizados por el hombre, la concentración elevada de azúcar reprime la conjugación debido al llamado efecto Crabtree. Los asci contienen de una a cuatro ascosporas de forma esférica o elipsoidal corta (Vaughan-Martini & Martini, 2011).

[0003] La fermentación es normalmente vigorosa para la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta especie fermenta glucosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. No fermenta lactosa, trehalosa y melibiosa. Fermenta galactosa de forma variable. No se ha observado crecimiento sobre nitrato como única fuente de nitrógeno. No se producen almidón o compuestos similares. Las temperaturas de crecimiento óptimas están comprendidas entre 25 °C y 30 °C, mientras que solo algunas cepas pueden crecer a 37 °C o 40 °C y algunas de ellas representan un posible riesgo para la salud humana ya que se convierten en patógenos oportunistas en individuos con deficiencia inmunológica (Vaughan-Martini & Martini, 2011; Thygesen y col., 2012).

[0004] En cuanto al genoma, su contenido de G+C (% G+C) está comprendido entre el 39 % y el 41 %. El genoma consta de 16 cromosomas. Los tamaños disponibles del genoma pueden variar desde 10,26 Mbp para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* CLIB382 (GeneBank Assembly ID: GCA_000209345.1) a 14,27 Mbps para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Y10 (GeneBank Assembly ID: GCA_000192375.1). El cromosoma mitocondrial es de aproximadamente 0,086 Mb (Foury y col., 1998), aunque se han informado variaciones en el tamaño y la secuencia de este importante elemento genético (Raiser y col., 2012). Pueden estar presentes elementos genéticos extracromosómicos, como los plásmidos, siendo el más conocido y mejor estudiado el plásmido de 2 µm utilizado como base para desarrollar vectores genéticos para diseñar las cepas de interés (Karim y col., 2013).

[0005] Los estudios sobre varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se han centrado principalmente en el campo de los productos de panadería, buscando cepas de levaduras que permitan una conservación de masa hecha de harina, agua y levadura durante periodos de tiempo superiores a una semana. De hecho, estos productos hechos con levaduras "conocidas" pueden almacenarse a temperaturas de refrigeración (4-8 °C) solo por unos días. Esto se debe a que las levaduras "conocidas" son insensibles a tales temperaturas y continúan con su actividad de fermentación, produciendo dióxido de carbono y etanol como metabolitos finales. Después de 3 días de almacenamiento a temperatura refrigerada, la acumulación continua de dióxido de carbono dentro de los paquetes de masa causa una hinchazón inaceptable desde el punto de vista de la calidad del producto. Además, la actividad metabólica de la levadura continúa, lo que repercute negativamente en las propiedades organolépticas y reológicas de la masa. En particular, una vez que se abre el paquete, la masa se caracteriza por olores desagradables debido a un alto contenido de etanol.

[0006] Con el fin de superar este problema, los paquetes sellados con una válvula de escape para el excedente de gas se han probado durante años. Sin embargo, los principales productores de masa cruda han abandonado gradualmente este tipo de paquetes debido a tres problemas: 1) el coste de la válvula es demasiado alto en comparación con el coste del paquete y el pequeño valor del contenido del producto; 2) en condiciones donde se

usa la cantidad apropiada de levadura para una buena fermentación, de todos modos, la válvula no permite que las presiones internas y externas del paquete sean iguales. Por lo tanto, es necesario dosificar cantidades muy bajas de levadura incluso cuando se usa la válvula, lo que resulta en una masa poco desarrollada y estructurada; 3) incluso en presencia de la válvula y una presión reducida dentro del paquete, la actividad metabólica de la levadura no se mantiene estable, comprometiendo así en pocos días las propiedades reológicas y organolépticas de la masa, lo que resulta en una estructura debilitada de la masa (lo que imposibilita que se extienda posteriormente) y con una importante alteración del olor y el sabor. Por todas estas razones, se han buscado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que pueden permanecer inactivas pero viables durante mucho tiempo a temperaturas entre 0 °C y 8 °C y reanudar la actividad metabólica normal, y la consiguiente producción de dióxido de carbono necesario para la fermentación, una vez que vuelven a las temperaturas óptimas de crecimiento. Esta característica también se conoce como "inactivación a baja temperatura", abreviada como LTi por sus siglas en inglés. Los documentos US5480798 y US5776526 describen cepas de levadura de la especie de *Saccharomyces cerevisiae* caracterizadas por el fenotipo LTi, que se sugiere aplicar en la fermentación de la masa. Estas cepas, a saber, *S. cerevisiae* NCIMB 40328; *S. cerevisiae* NCIMB 40329; *S. cerevisiae* NCIMB 40330; *S. cerevisiae* NCIMB 40331; *S. cerevisiae* NCIMB 40332; *S. cerevisiae* NCIMB 40611; *S. cerevisiae* NCIMB 40612; *S. cerevisiae* NCIMB 40613; *S. cerevisiae* NCIMB 40614 y *S. cerevisiae* NCIMB 40615 se obtuvieron mediante técnicas *in vitro* y selección posterior. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* desprovista de las desventajas mencionadas anteriormente de las cepas conocidas que ya están en uso para la misma aplicación.

Sumario de la invención

[0007] La invención se refiere, por lo tanto, a una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* depositada con número de acceso (o número de registro) DSM 29004 ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

[0008] De acuerdo con la presente invención, dicha cepa de levadura, aislada de la masa de levadura espontánea, puede permanecer viable a temperaturas por debajo de 8 °C, en presencia de una actividad de agua menor o igual a 0,98, en un estado inactivo con respecto a la producción de dióxido de carbono y puede restaurar la capacidad normal de fermentación y leudación cuando se devuelve a un intervalo de temperatura óptimo.

[0009] En otro aspecto, la invención se refiere, por lo tanto, a una masa sólida o fluida que comprende al menos agua, harina y levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, depositada con el número de acceso DSM 29004.

[0010] De acuerdo con otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, depositada con el número de acceso DSM 29004 ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, para la producción de masas sólidas o fluidas.

[0011] De acuerdo con otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una masa refrigerada en forma sólida o fluida, preparada mezclando al menos agua, harina y levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* con el número de acceso DSM 29004 ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en el que dicha masa se empaqueta en un recipiente.

[0012] Por lo tanto, la cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* según la presente invención permanece sorprendentemente inactiva, aunque viable durante un largo tiempo, a temperaturas por debajo de 8 °C y reanuda la actividad metabólica normal produciendo dióxido de carbono, lo que permite la fermentación cuando se devuelve a temperaturas óptimas para el crecimiento, y en esto su comportamiento es dramáticamente distinto de las levaduras de cerveza "conocidas" caracterizadas por el comportamiento mencionado anteriormente e inconvenientes con respecto al almacenamiento de masas crudas.

[0013] En una realización adicional más, la invención se refiere a un proceso para la preparación de un medio que tiene una alta concentración de nitrógeno alfa-amino, que comprende las etapas de:

- cultivo de la cepa de levadura DSM 29004 en un medio de extracto de malta de cebada y de malta de trigo durante al menos 36 horas;
- separación de la levadura del medio, preferiblemente por filtración o por centrifugación;
- obtención de un medio que tiene una alta concentración de nitrógeno alfa-amino superior a 300 mg/l, en el que el nitrógeno alfa-amino no se agrega al medio, sino que resulta del crecimiento de la levadura.

[0014] Definiciones en la presente invención:

- Se entiende por "cepa DSM 29004" una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, presentada el 01.07.2014 con el número de acceso (o número de registro) DSM 29004 ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;

- Se entiende por "manipulación genética" cualquier intervención técnica destinada a dirigir el proceso de adquisición de características genéticas específicas que se expresan como rasgos fenotípicos correspondientes, comprendiendo las intervenciones técnicas (Sturley & Young, 1986): (i) cruce de cepas naturales, seguido por la selección; (ii) producción de híbridos seguido de selección; (iii) transformación, es decir, inserción de ADN exógeno en cromosomas o en el genoma mitocondrial, u otros elementos genéticos tales como plásmidos. (iv) La mutagénesis aleatoria inducida generalmente seguida de la selección y/o producción de híbridos (Nevoigt 2008) se puede agregar como un modo adicional de manipulación;
- Se entiende por "variante esencialmente derivada" una variante de la cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, depositada en el DSMZ el 01.07.2014 con el número de acceso DSM 29004, que puede rastrearse mediante un perfilado de ADN microsatélite o debido a un rasgo genético distintivo detectable mediante secuenciación del genoma y análisis comparativo. En el presente caso, los perfiles de ADN microsatélite de las variantes esencialmente derivadas pueden ser idénticos al DSM 29004, pero pueden tener secuencias diferentes a este en regiones genómicas distintas a los *loci* de ADN microsatélite como resultado de mutaciones espontáneas, mutaciones inducidas, hibridaciones u otros métodos de manipulación genética. Una posible realización de cualquier variante esencialmente derivada de la cepa DSM 29004 es un linaje de la cepa DSM 29004 depositada en el DSMZ el 01.07.2014 con el número de acceso DSM 29004 que comparte con ella los mismos perfiles de ADN microsatélite para 10 *loci*, tal como se indica en la Tabla 3, pero se caracteriza por una mayor tolerancia al estrés osmótico y una mayor capacidad de supervivencia tras el secado durante la producción de la cepa DSM 29004 como levadura seca activa. La secuencia del genoma de este nuevo linaje derivado esencialmente de la cepa DSM 29004 podría caracterizarse por una secuencia genómica diferente de la cepa DSM 29004 hasta en un 30 %, a excepción de los *loci* de ADN microsatélite.
- Se entiende por "cepa de levadura inactiva pero viable" una cepa de levadura que no produce dióxido de carbono o produce cantidades casi imperceptibles del mismo, pero que puede reanudar la actividad metabólica y mantener el proceso de fermentación de una masa a base de harina y agua, triplicando el volumen de la masa original al pasar a la temperatura óptima de crecimiento;
- "Vigor fermentativo" se refiere a la actividad de una cepa de levadura para consumir los azúcares disponibles y producir dióxido de carbono, permitiendo así la fermentación con la textura deseada de la masa fermentada;
- Se entiende por "productos de panadería" pan, pizza, pan plano (*focaccia*), bollos salados pequeños (*tigelle*), pero también productos con levadura adecuados para freír en forma de rectángulos de masa inflada frita (*gnocco frito*) y empanadillas fritas (*panzerotti*);
- "Atmósfera modificada" o "atmósfera protectora" se refiere a una atmósfera con mezcla de gases que incluye dióxido de carbono en porcentajes de 0 % a 60 % y nitrógeno de 0 % a 80 %, preferiblemente 50 % de dióxido de carbono y 50 % de nitrógeno;
- La "ausencia sustancial de producción de dióxido de carbono" puede ocurrir cuando se agrega levadura a una masa hecha de harina y agua. Dicha mezcla mantenida entre 0 °C y 8 °C da como resultado un posible aumento de la concentración de dióxido de carbono en el paquete que comprende del 0 % al 5 % de la concentración inicial justo después de sellar el paquete. La hinchazón del paquete sellado podría ser una señal indirecta de que la producción de gas por parte de la levadura está por encima del rango establecido.
- "medio de crecimiento" (sinónimos: medio de crecimiento/caldo de cultivo/caldo de crecimiento) se refiere a un sustrato que contiene todos los compuestos (factores) requeridos por un microorganismo para la replicación celular que resulta en el aumento del número de células individuales y el crecimiento de la población. En este contexto, los microorganismos están pensados principalmente como levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias del ácido láctico que pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Los factores requeridos por los microorganismos para su crecimiento en el medio pertenecen principalmente a las categorías: fuente de carbono, fuente de nitrógeno asimilable (constituida por amoníaco y aminoácidos libres, el último también conocido como FAN), vitaminas y sales (oligoelementos). Las fuentes típicas de carbono son la melaza de caña de azúcar, la melaza de remolacha, el extracto de malta de cebada y el extracto de malta de trigo;
- "medio desechado" se refiere a uno de los componentes obtenidos después de la separación y recolección de las células de levadura viables del medio de crecimiento, que se caracteriza por una menor concentración en la fuente de carbono y nitrógeno asimilable, ya que se convierten en masa celular durante el crecimiento de las levaduras, pero que todavía contiene FAN y otros factores esenciales, también derivados del metabolismo de las levaduras cultivadas;
- "célula no vital/células no viables, extractos celulares, lisado celular" se refiere a subproductos derivados del crecimiento de la cepa DSM 29004 en un medio de cultivo. Por lo tanto, los residuos celulares derivados de células no viables, extractos celulares y lisado celular pueden separarse a partir de células viables mediante centrifugación y/o filtración, y luego recuperarse en el medio desechado. La composición de células no vitales/células no viables, extractos celulares y lisado celular está estrictamente relacionada con las propiedades metabólicas y fisiológicas únicas de la cepa DSM 29004.

Descripción de las figuras

[0015] A continuación, la invención se describirá en detalle y con referencia a las Figuras adjuntas, en las que:

La **Figura 1** muestra la imagen de un gel de agarosa que muestra los resultados de la PCR específica de especie para *Saccharomyces cerevisiae*, lo que confirma que la cepa DSM 29004 pertenece a esta especie, como se describe en el Ejemplo 1. El orden de carga es el siguiente: M) marcador de tamaño O'GeneRuler DNA Ladder Mix, Ready-to-Use 100 to 10.000 bp (Thermo Scientific); 1) *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004; 2)

Saccharomyces cerevisiae CBS 1171^T; 3) Sin control de plantilla; La **Figura 2a** muestra, en una reproducción de la imagen de un gel de agarosa, resultados de la PCR que muestran el perfil de ADN microsatélite para los *loci* SC8132X, YOR267C SCPTSY7 y para el *locus* C5 después de la electroforesis en gel de agarosa al 3 % p/v, como en el Ejemplo 1. El orden de carga es el siguiente: M) marcador de tamaño O'GeneRuler DNA Ladder Mix, Ready-to- Use 100 to 10.000 bp (Thermo Scientific); 1)

Saccharomyces cerevisiae DSM 29004; 2) *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171^T; 3) Sin control de plantilla; La **Figura 2b** muestra la foto de un gel de agarosa con los resultados de la PCR mostrando el perfil de ADN microsatélite los *loci* SC8132X, YOR267C SCPTSY7 y para el *locus* C5 después de la electroforesis en gel de agarosa al 3 % p/v, como se indica en el Ejemplo 8. El orden de carga es el siguiente M) marcador de tamaño O'GeneRuler DNA Ladder Mix, Ready-to- Use 100 to 10.000 bp (Thermo Scientific); 1) *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40611; 2) *S. cerevisiae* NCIMB 40612; 3) *S. cerevisiae* NCIMB 40613; 4) *S. cerevisiae* NCIMB 40614; 5) *S. cerevisiae* NCIMB 40615; 6) *S. cerevisiae* NCIMB 40328; 7) *S. cerevisiae* NCIMB 40329; 8) *S. cerevisiae* NCIMB 40330; 9) *S. cerevisiae* NCIMB 40331; 10) *S. cerevisiae* NCIMB 40332; 11) *S. cerevisiae* DSM 29004; 12) *S. cerevisiae* CBS 1171^T; 13) Sin control de plantilla.

La **Figura 3** muestra los perfiles de ADN microsatélites para los *loci* YGL139W, YFR028C, YGL014W, YOL109W, YML091C, YLL049W, YBR240C, YDR160W, YPL009C, YOR267C por separación de fragmentos en un capilar como se detalla en el Ejemplo 1. Los tamaños (*) se expresan en pares de bases (bp) y con un error de +/- 1 bp. Se muestran los picos principales observados para cada *locus*, hasta un máximo de dos;

La **Figura 4** muestra los datos del panel de prueba mostrados en un diagrama de Kiviat o "gráfico radar" que informa de los datos de múltiples variables: apariencia de la masa, olor de la masa, apariencia del producto cocido, alveolación de la masa, suavidad, olor del producto cocido, sabor general y agrado, como se describe en el Ejemplo 7.

La **Figura 5** muestra la representación gráfica del análisis de componentes principales, como se describe en el Ejemplo 8.

La **Figura 6** muestra, en una reproducción, uno de los dos perfiles cromatográficos replicados que representan los compuestos volátiles obtenidos por fermentación del medio M4 a base de extractos de malta de cebada y trigo con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM29004 durante 72 horas a 27 °C en un matraz agitado, como se indica en el Ejemplo 10.

La **Figura 7a.** muestra un cultivo líquido de la cepa *Lactobacillus sanfranciscensis* LMG 17498^T en el medio DSM 225 (conocido también como "*Dough Like Medium*") producido según el protocolo publicado por DSMZ y basado en un extracto de levadura fresca de la cepa DSM 29004 como se describe en el Ejemplo 14.

La **Figura 7b.** muestra la cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* LMG 11384^T en medio MRS suplementado, en la proporción 1:10 v/v, con el medio desechado obtenido después del crecimiento de las cepas de levadura DSM 29004 y CBS 1171^T en medio M4. MRS sin suplementos es el medio de control, como se describe en el Ejemplo 14.

La **Figura 7c.** muestra la cinética de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* LMG 11488^T en medio MRS suplementado, en la proporción 1:10 v/v, con el medio desechado obtenido después del crecimiento de las cepas de levadura DSM 29004 y CBS 1171^T en medio M4. MRS sin suplementos es el medio de control, como se describe en el Ejemplo 14.

La **Figura 7d.** muestra la cinética de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* LMG 6893^T en medio MRS suplementado, en la proporción 1:10 v/v, con el medio desechado obtenido después del crecimiento de las cepas de levadura DSM 29004 y CBS 1171^T en medio M4. MRS sin suplementos es el medio de control, como se describe en el Ejemplo 14.

La **Figura 7e.** muestra la cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* DSM 20174^T en medio MRS suplementado, en la proporción 1:10 v/v, con el medio desechado obtenido después del crecimiento de las cepas de levadura DSM 29004 y CBS 1171^T en medio M4. MRS sin suplementos es el medio de control, como se describe en el Ejemplo 14.

La **Figura 7f.** muestra la cinética de crecimiento de *Lactobacillus brevis* DSM 20054^T en medio MRS suplementado, en la proporción 1:10 v/v, con el medio desechado obtenido después del crecimiento de las cepas de levadura DSM 29004 y CBS 1171^T en medio M4. MRS sin suplementos es el medio de control, como se describe en el Ejemplo 14.

La **Figura 7g.** muestra la cinética de crecimiento de *Lactobacillus fermentum* LMG 6902^T en medio MRS suplementado, en la proporción 1:10 v/v, con el medio desechado obtenido después del crecimiento de las cepas de levadura DSM 29004 y CBS 1171^T en medio M4. MRS sin suplementos es el medio de control, como se describe en el Ejemplo 14.

Descripción detallada de la invención

[0016] Por lo tanto, la invención se refiere a una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, presentada el 01.07.2014 con el número de acceso DSM 29004 ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

[0017] Como ejemplo no limitativo, un rasgo distintivo de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 y de las cepas esencialmente derivadas se proporciona mediante el perfil de ADN microsatélite, definido por el análisis de polimorfismos de longitud en *loci* caracterizados por la presencia de Secuencias Simples Repetidas o SSR.

[0018] La cepa de acuerdo con la presente invención se caracteriza genotípicamente y es identificable de manera clara y definida por rasgos específicos identificados dentro del genoma. Esta cepa ha evolucionado espontáneamente, sin ninguna intervención directa o manipulación genética, y tiene las características relevantes para su aplicación industrial típicas de una cepa de "inactivación a baja temperatura" o LTI, representada por la capacidad de ser almacenada en una forma inactiva pero viable a bajas temperaturas (en un rango entre 0 °C y 8 °C) y reactivada simplemente aumentando la temperatura ambiente a un rango entre 12 °C y 38 °C, preferiblemente entre 25 °C y 28 °C. La reactivación se manifiesta como el consumo de los azúcares disponibles y la producción de dióxido de carbono que, en condiciones adecuadas, hace posible la fermentación con la alveolación deseada de la masa fermentada.

[0019] La cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 de una masa fermentada espontáneamente (masa madre) de origen italiano, aislada por diluciones seriadas en solución salina seguidas de cultivo en medio selectivo de *Saccharomyces* y refrescada periódicamente mediante la adición de una mezcla de agua y harina sin levadura, se presentó ante Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 1 de julio de 2014 y se le asignó el número de depósito DSM 29004.

[0020] La cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con la presente invención, permanece, por tanto, sorprendentemente inactiva, pero vital durante mucho tiempo, a temperaturas inferiores a 8 °C y luego retoma la actividad metabólica normal, con producción de dióxido de carbono que permite el proceso de fermentación, cuando se devuelve a las temperaturas óptimas para el crecimiento, y en esto su comportamiento es drásticamente distinto de las levaduras de cerveza "conocidas" caracterizadas por el comportamiento y los inconvenientes mencionados anteriormente con respecto al almacenamiento de masas crudas.

[0021] Para verificar y determinar las características de la cepa DSM 29004, y para descartar la superposición de esta cepa con las cepas descritas en el estado de la técnica, se realizó una comparación de genotipos entre DSM 29004 y las cepas de *S. cerevisiae* NCIMB 40611, NCIMB 40612, NCIMB 40613, NCIMB 40614, NCIMB 40615, NCIMB 40328, NCIMB 40329, NCIMB 40330, NCIMB 40331, NCIMB 40332 y CBS1171^T. En el Ejemplo 8 se describen las etapas experimentales y los resultados mostrados en la Figura 2b.

[0022] En la Figura 2b se muestra claramente que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM29004 en el carril 11 es diferente de las otras cepas que se describen en el estado de la técnica debido a tres bandas específicas (banda A, banda B y banda C) en el patrón de ADN de microsatélite, comprendidas en el rango entre 350 pb y 500 pb.

[0023] Los resultados indican claramente que DSM 29004 es una nueva cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con características mejoradas.

[0024] En una realización preferida, la cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, depositada con el número de acceso DSM 29004 en el DSMZ el 01.07.2014 y las cepas esencialmente derivadas, se caracteriza por el hecho de que dicha cepa permanece viable durante al menos 20 días. a una temperatura comprendida entre 0 °C y +8 °C, y dicha cepa, posteriormente desplazada a una temperatura entre +12 °C y +38 °C, muestra el vigor fermentativo y la actividad de crecimiento. La ausencia sustancial de producción de dióxido de carbono es evidente en el caso de que la levadura se agregue a una masa hecha de harina y agua. Dicha mezcla mantenida entre 0 °C y 8 °C no provoca el hinchamiento de un paquete sellado, una clara señal de que la producción de gas por parte de la levadura tiende a cero. Por otra parte, el vigor fermentativo se hace evidente cuando la misma masa, después de 20 días de almacenamiento en un paquete sellado a temperaturas variables en un rango comprendido entre 0 °C y 8 °C, se deja a temperatura ambiente (20-25 °C) durante aproximadamente 20 minutos, alcanzando un volumen que triplica su volumen original, mostrando así una excelente acción fermentativa de la levadura. La recuperación de la actividad fermentativa de la levadura a temperaturas de 20-25 °C (temperatura ambiente), después de una etapa de almacenamiento refrigerado, permite tener productos terminados que se caracterizan por una buena alveolación y suavidad y textura crujiente de la masa, al mismo tiempo. La cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 ha demostrado ser extremadamente ventajosa para su aplicación industrial en actividades de fermentación, cuando se utiliza como ingrediente alimentario.

[0025] En otra realización, la cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, depositada con el número de acceso DSM 29004 en el DSMZ el 01.07.2014, se caracteriza porque dicha cepa permanece viable durante al menos 30 días a una temperatura entre 0 °C y +6 °C, y posteriormente muestra vigor fermentativo y actividad de crecimiento a temperaturas comprendidas entre 12 °C y 38 °C, preferiblemente entre 25 °C y 28 °C.

[0026] La ausencia sustancial de producción de dióxido de carbono es evidente en el caso de que la levadura se añada a una masa hecha de harina y agua. Dicha mezcla mantenida entre 0 ° y 6 °C no produce un hinchamiento de un paquete sellado, lo que es una clara señal de que la producción de gas por parte de la levadura tiende a cero. Por otro lado, el vigor fermentativo se hace evidente cuando la misma masa, después de 30 días de

almacenamiento en un paquete sellado a temperaturas variables en el rango comprendido entre 0 °C y 8 °C, se deja a temperatura ambiente (20-25 °C) durante aproximadamente 20 minutos, alcanzando un volumen que es 2,5 veces superior al volumen original, demostrando así una importante acción fermentativa de la levadura.

[0027] Esta característica también se denomina "inactivación a baja temperatura", abreviada como LTi. El carácter LTi es multifactorial y depende de múltiples *loci* definidos como "*loci* de caracteres cuantitativos" (QTL); el genotipo asociado con el fenotipo de interés aún no se ha descrito. Los métodos de manipulación genética dirigida no pueden producir el resultado deseado en estos casos, por lo que a menudo se obtienen mejores resultados mediante una estrategia de manipulación "ciega", como la conjugación de cepas seleccionadas por reproducción sexual. De acuerdo con los conocimientos actuales, todas las cepas de la especie de *Saccharomyces cerevisiae* que se describen como poseedoras de esta característica se han obtenido mediante manipulación genética, en particular mutagénesis aleatoria inducida, seguida de conjugación o producción de híbridos con otras cepas seleccionadas. En un caso particular, el proceso consistió en la fusión de cepas obtenidas por mutagénesis con dos cepas de levadura seleccionadas por su alto vigor fermentativo y normalmente utilizadas en el campo de los productos de panadería. Las cepas naturales con características de LTi aisladas de la masa con levadura natural de origen italiano no se conocían previamente.

[0028] En un aspecto preferido, la cepa de levadura de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que dicha cepa muestra un mayor vigor fermentativo en la fermentación de la masa, cuando se cultiva previamente en un medio de extracto de malta de cebada y de malta de trigo que cuando se cultiva en un medio basado en melazas, a una temperatura comprendida entre +12 °C y +38 °C, preferiblemente entre +25 °C y +28 °C.

[0029] Preferiblemente, dicho medio de extracto de malta de cebada y malta de trigo se encuentra en una concentración que oscila entre 0,1 g/l y 100 g/l, preferiblemente comprendido entre 40 g/l y 80 g/l, y dicho medio basado en melazas tiene una concentración de glucosa que oscila entre 0,1 g/l y 200 g/l, preferiblemente entre 20 g/l y 100 g/l.

[0030] En una realización adicional, la invención se refiere a una masa sólida o fluida que comprende al menos agua, harina y levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* depositada con el número de acceso DSM 29004.

[0031] Se han descrito otras características ventajosas de la cepa de acuerdo con la invención.

[0032] Sorprendentemente, la cepa DSM29004 producida con el medio tradicional a base de melaza libera aromas frutales. El medio a base de melaza generalmente tiene un olor desagradable, al igual que la levadura que crece en ese medio. Esto suele causar problemas con el sabor de la masa que contiene levadura cultivada en medios a base de melaza. Sorprendentemente, el olor de la cepa de acuerdo con la invención, cultivada en medio a base de melaza durante al menos 72 horas, es sustancialmente más agradable que las cepas normales de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que añade sabores agradables a la masa, en lugar de empeorar el sabor de la misma masa (según se indica en el Ejemplo 9).

[0033] Después del crecimiento de la cepa DSM 29004 en un extracto de malta de cebada y un extracto de malta de trigo suplementado con fuentes de nitrógeno, otras sales y vitaminas (como se muestra en la Tabla 8), el medio desechado resultante se analizó para determinar el contenido de nitrógeno alfa-amínico (la fuente de nitrógeno también conocida cuando se hace referencia a la levadura como FAN o nitrógeno amino libre, y como nitrógeno alfa-amínico para bacterias) y se descubrió que el medio desechado del crecimiento de DSM 29004 se caracterizaba por un mayor contenido de nitrógeno alfa-amínico en comparación con las otras cepas analizadas como se describe en el Ejemplo 13. El nitrógeno alfa-amínico es una fuente de factores esenciales para el crecimiento de microorganismos, como las bacterias del ácido láctico, especialmente las bacterias del ácido láctico que están bien adaptadas a la masa y a la masa fermentada.

[0034] La presencia de bacterias del ácido láctico es esencial para mejorar la textura y los sabores de la masa, dándole una fragancia más natural (como se describe en el Ejemplo 14).

[0035] Se observó que el medio mostrado en la Tabla 8, una vez descartado después del crecimiento de DSM29004, tiene sorprendentemente la capacidad de aumentar el crecimiento de bacterias del ácido láctico que pertenecen al género *Pediococcus*, al mismo tiempo sin tener efectos negativos en el crecimiento normal de las otras bacterias del ácido láctico. También se observó que dicho medio desechado se caracteriza por la ausencia de dióxido de azufre, que, sin embargo, suele ser producido por la levadura durante la fermentación. La presencia de dióxido de azufre inhibe el crecimiento de las bacterias del ácido láctico, por lo que no es ventajosa en la fermentación de la masa (Ejemplo 12) y representaría un obstáculo insuperable en el caso de que el medio desechado se añadiera a la masa junto con la cepa de levadura como suplemento. Por el contrario, el medio desechado después del crecimiento de DSM29004, al estar sustancialmente exento de dióxido de azufre, es adecuado para ser añadido a una masa como suplemento, aprovechando así su mencionada capacidad para potenciar el crecimiento de bacterias del ácido láctico.

[0036] Al mismo tiempo, la presencia de extractos de malta de cebada y de trigo en el medio (como se muestra en la Tabla 8) induce la expresión de los genes relacionados con la fermentación de la maltosa. La maltosa es el azúcar presente principalmente en la masa de productos horneados. Por lo tanto, la cepa DSM 29004 cultivada en un medio como el que se muestra en la Tabla 8, una vez en una masa de producto horneado, utilizará la maltosa de manera más eficaz y mostrará mayor celeridad, mayor rapidez y más vigor que la cultivada en un medio a base de melazas, favoreciendo así la fermentación de la masa (véase el Ejemplo 11). Esta característica de una mejor fermentación de la cepa DSM 29004 cultivada en un medio como el de la Tabla 8 representa una ventaja consistente en el uso de las cepas de Lti, ya que se sabe que estas cepas se muestran, incluso a temperaturas que generalmente son óptimas para la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* una actividad metabólica más baja y esto generalmente conlleva una fermentación insuficiente o un largo tiempo necesario para una fermentación decente. Los productos horneados como el pan, la pizza, el pan plano (*focaccia*), los bollos salados (*tigelle*), pero también los productos con levadura adecuados para freír productos como los rectángulos de masa inflada frita y las empanadillas fritas se obtienen a partir de masas a base de harina. Las realizaciones implican la producción de una masa que puede estar en forma sólida o fluida. La principal diferencia entre estas masas es la mayor cantidad de agua que se agrega como ingrediente de la mezcla líquida.

[0037] En particular, la masa fluida se refiere a una mezcla con viscosidad, medida por un viscosímetro rotacional Brookfield, comprendida entre 47.000 cP (mPa·s) y 800 cP (mPa·s) a 50 rpm, con impulsor R7 y R3, respectivamente, o entre 36.000 cP (mPa·s) y 600 cP (mPa·s) a 100 rpm, con impulsor R7 y R3 respectivamente, en cada caso a una temperatura de 20 °C. Esta condición permite obtener una masa fluida deslizante, que en particular se distribuye por gravedad en el espacio disponible una vez que se vierte en los respectivos medios de soporte (bandeja de hornear).

[0038] En particular, se dispone que tales masas contienen harina, principalmente harina de trigo, especialmente una harina de trigo duro o blando o una mezcla de las mismas. Además, la harina de trigo es preferiblemente del tipo "0". Sin embargo, debe entenderse que también puede emplearse harina de otras fuentes, preferiblemente harina de espelta y posiblemente otras harinas tales como arroz, trigo sarraceno, centeno u otras harinas sin gluten. También se pueden utilizar harinas procedentes de la agricultura ecológica.

[0039] Se dispone que la masa sólida contiene harina en una proporción comprendida entre el 50 % y el 70 % en peso de la masa, aunque es preferible una proporción comprendida entre el 54 % y el 67 % en peso de la masa. Se establece que la masa sólida contiene dicha harina en una proporción comprendida entre el 43,5 % y el 60,6 % en peso de la masa y preferiblemente entre el 44,5 % y el 50,5 % en peso de dicha masa. En particular, con el fin de obtener una masa fluida con las características mencionadas anteriormente, dicha harina debe mostrar una fuerza igual o superior a 220 W medida por el alveógrafo Chopin.

[0040] Se pretende que estas masas contengan agua. En el caso de la masa sólida, el agua se agrega a la harina en una proporción comprendida entre el 30 % y el 40 % en peso de la masa y preferiblemente en una proporción comprendida entre el 33 % y el 36 % en peso de la masa. En el caso de la masa fluida, el agua se agrega en una proporción comprendida entre el 35,5 % y el 56,5 % en peso de la masa, pero preferiblemente en una proporción entre el 44,5 % y el 50,9 % en peso de la masa.

[0041] Para obtener una masa sólida, se agrega la levadura DSM 29004 o una cepa esencialmente derivada en una proporción comprendida entre 0,4 % y 2,4 % en peso de masa, preferiblemente en una proporción comprendida entre 0,8 % y 1,3 % en peso de masa. Para obtener una masa fluida, la cepa de levadura DSM 29004 o una cepa esencialmente derivada se agrega en una proporción de hasta un máximo de 1,8 % en peso de masa, preferiblemente en una proporción comprendida entre 0,6 % y 0,8 % en peso de masa.

[0042] Se inocula entre $1 \cdot 10^5$ CFU/g de masa y $1 \cdot 10^7$ CFU/g de masa, preferiblemente $5 \cdot 10^6$ CFU/g de masa, de la levadura DSM 29004 o una cepa esencialmente derivada. Además, se añade sal o cloruro de sodio para obtener dicha masa. En particular, dicha sal está en una cantidad de hasta un máximo de 2 % en peso de masa, preferiblemente en una cantidad comprendida entre 0,7 % y 1,8 % en peso de masa. Además, para obtener dicha masa, se añaden preferiblemente una masa de aceite y/o grasa dietética, o una mezcla de aceites y/o grasas dietéticas. Preferiblemente se usa aceite de oliva y más preferiblemente aceite de oliva virgen extra. Dicho aceite y/o grasa dietética se añade en una proporción de hasta un máximo de 6 % en peso de masa, preferiblemente en una proporción comprendida entre 1,9 % y 5,5 % en peso de masa. También se pueden utilizar aceites procedentes de la agricultura ecológica. Además, se agrega preferiblemente extracto de malta o harina de grano malteado para obtener dicha masa. Dicho extracto de malta o harina de grano malteado es una proporción de hasta un máximo de 0,8 % en peso de masa. También se podría utilizar extracto de malta o harina de grano malteado de la agricultura ecológica.

[0043] Preferiblemente, dicha masa también contiene un coadyuvante de fermentación. En particular, dicho coadyuvante de fermentación comprende una base seca de masa fermentada ácida de harina, en particular hecha de trigo blando, gluten, ácido L-ascórbico y alfa-amilasa. En particular, dicho coadyuvante de fermentación está en una cantidad inferior o igual al 0,6 % en peso de masa. También se podría utilizar un coadyuvante de procesamiento "BIO".

[0044] Además, dicha mezcla contiene preferiblemente levadura desactivada. En particular, dicha levadura desactivada está en una cantidad inferior al 2 % en peso de la masa.

[0045] Un primer procedimiento para hacer un producto de panadería, en particular pizza, implica mezclar la harina junto con dicho coadyuvante y dicha malta, y la adición de dicha levadura y dicha levadura desactivada.

[0046] Se añaden agua y aceite o grasa en una etapa posterior y se lleva a cabo una primera mezcla de la masa. Luego se agrega sal y se realiza una segunda mezcla, logrando así la etapa de una masa para hornear que está lista para su posterior procesamiento y que se encuentra en forma sólida, fluida o sustancialmente fluida de acuerdo con la receta seguida para su elaboración.

[0047] En el caso de la masa fluida, esta se vierte en una bandeja para hornear y se extiende libremente en el espacio de contención definido por la bandeja. En el caso de una masa sólida, esta se extiende mecánicamente siempre dentro de la bandeja respectiva. Dicha masa estirada se puede definir como la base el producto de panadería.

[0048] La base así obtenida se entrega a una celda de fermentación, donde se somete a una fermentación conveniente. En particular, dicha fermentación se realiza en un entorno adecuadamente controlado en cuanto a temperatura y humedad, y en particular se extiende durante un intervalo de tiempo de aproximadamente dos horas.

[0049] Posteriormente, el tomate fluido o sustancialmente fluido, particularmente en forma de salsa, pulpa o pasta de tomate, se extiende sobre la superficie superior de dicha base.

[0050] En una siguiente etapa, la base cubierta con tomate se cocina en un horno especial.

[0051] A continuación, se añade una capa a la superficie superior de la base, que preferiblemente consistirá simplemente en trozos de queso mozzarella.

[0052] Obviamente, esta etapa no estaría presente en la preparación de productos tales como pan plano, bases para pizza o similares.

[0053] Posteriormente, el producto podrá ser envasado en el paquete respectivo.

[0054] Otro procedimiento muy similar puede proporcionar una etapa de cocción preliminar de la base blanca y la posterior cobertura de la superficie superior con tomate, queso mozzarella y otros ingredientes deseados.

[0055] Sin embargo, debe entenderse que también se podría obtener un pan plano correspondiente (*focaccia*) usando un proceso que proporciona dichas etapas hasta completar la base del producto, obtenida después de la fermentación del producto, seguida, por ejemplo, de la cobertura de la superficie superior con aceite y otros posibles ingredientes, y la cocción correspondiente.

[0056] Un segundo procedimiento para obtener un producto de panadería conlleva el envasado directo de la masa, tanto en forma sólida como fluida, en un envase adecuado.

[0057] En este caso, inmediatamente después de mezclar los ingredientes, la masa se divide en partes alícuotas y se fermenta previamente a una temperatura aproximada de 20-25 °C durante un período de tiempo de 30 a 60 minutos, preferiblemente 30 minutos. Las diferentes partes alícuotas de la masa se enfrían luego en una celda de enfriamiento adecuada, hasta que la temperatura central del producto alcanza los 4 °C.

[0058] En un aspecto adicional, la presente invención comprende una masa dividida en partes alícuotas. Dichas partes alícuotas pueden fermentarse previamente a una temperatura de aproximadamente 20-25 °C durante un período de tiempo de 30 a 60 minutos, preferiblemente 30 minutos.

[0059] Posteriormente, las partes alícuotas individuales se envasan en paquetes especiales termosellados o sin sellar. El envasado puede tener lugar en condiciones de atmósfera modificada o atmósfera normal. En cuanto al envasado en atmósfera modificada o protectora, la mezcla de gases incluye el dióxido de carbono utilizado en proporciones de 0 % a 60 % y el nitrógeno utilizado en proporciones de 0 % a 80 %, preferiblemente 50 % de dióxido de carbono y 50 % de nitrógeno.

[0060] En este segundo procedimiento, el consumidor final almacena la masa envasada directamente en el frigorífico o, en cualquier caso, a temperaturas comprendidas en un intervalo de 0 °C a 8 °C, preferiblemente a temperaturas en un intervalo de 0 °C a +6 °C.

[0061] El producto se almacena en las condiciones anteriores durante un período de 20 días a temperaturas en un intervalo de 0 °C a +8 °C, preferiblemente durante un período de 30 días a temperaturas en un intervalo de 0 °C a +6 °C.

[0062] Durante este período de almacenamiento, la masa envasada se utiliza para la producción de un producto de panadería, tal como pan, pizza y pan plano (*focaccia*), pero también para la producción de productos fermentados adecuados para freír.

[0063] La masa sólida se retira del paquete y se deja reposar a temperatura ambiente (20-25 °C), preferiblemente durante aproximadamente 20-30 minutos. Después de este tiempo, la masa se enrolla sobre un soporte adecuado espolvoreado con harina y se lleva al tamaño deseado manteniendo un grosor de lámina de aproximadamente 4-5 mm. Sin embargo, el grosor y el tamaño son variables en función del producto final que se desee obtener.

[0064] Para la elaboración de productos de panadería, la masa se adorna en la superficie superior con diferentes ingredientes dependiendo del producto que se desea obtener. En el caso de la elaboración de una pizza, la masa enrollada se cubrirá con tomate en forma líquida o sustancialmente líquida, en particular en forma de salsa, pulpa o pasta de tomate, y con trozos de queso mozzarella y otros ingredientes deseados. También es posible planear una etapa de horneado en el horno de la masa enrollada sola, seguido por el relleno de la superficie superior.

[0065] En el caso de la producción de una *focaccia* o pan plano, la superficie superior de la base se aceitará con aceite de oliva y se espolvoreará con sal según se desee.

[0066] La masa enrollada recubierta, en ambos casos, se somete a cocción. De este modo se completa el producto de panadería.

[0067] Para la elaboración de productos fermentados adecuados para freír, la fase para la preparación de la masa corresponde a la descrita para productos horneados. La diferencia está en la cocción del producto, que no se hace en el horno sino en aceite y/o grasa para freír.

[0068] El uso de una masa fluida implica la apertura del paquete y la masa se debe verter en una bandeja para hornear engrasada. La viscosidad de la masa permite su distribución por gravedad en el espacio disponible dentro del soporte. En este caso, es posible facilitar la propagación mediante una ligera acción mecánica para cubrir toda la superficie de la bandeja.

[0069] Se deja reposar la masa a temperatura ambiente (20-25 °C) en la bandeja para hornear cubierta con una película de plástico para evitar el endurecimiento de la superficie.

[0070] En este punto es posible proceder a la elaboración de productos horneados con las mismas modalidades de preparación descritas anteriormente.

[0071] Un aspecto adicional de la masa según la presente invención es una masa en la que dicha cepa de levadura DSM 29004 de la especie *Saccharomyces cerevisiae* está en forma de células viables.

[0072] Dicha cepa y las cepas esencialmente derivadas están en forma de células viables. La cepa en cuestión se puede usar para obtener dicha masa como mezcla con otras levaduras y microorganismos viables, no viables y extractos o lisados de levaduras u otros microorganismos.

[0073] Según un aspecto adicional de la presente invención, la masa es una mezcla en la que dicha levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* se mezcla con otras levaduras y/o microorganismos viables, no viables, extractos o lisados de otras levaduras y otros microorganismos.

[0074] Según otro aspecto adicional, la masa de la presente invención se caracteriza por que no muestra hinchamiento del paquete, desarrollo de olor y sabor anormales o formación de líquido dentro del paquete cuando se almacena a una temperatura entre 0 °C y +8 °C durante 20 días, o preferiblemente a una temperatura entre 0 °C y +6 °C durante 30 días.

[0075] Según otro aspecto, la invención se refiere al uso de la cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, depositada con el número de registro DSM 29004 ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, para la producción de masas sólidas o fluidas.

[0076] Los usos comprenden la aplicación para la masa sólida o fluida de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 y las cepas esencialmente derivadas. Como ejemplo no exclusivo, un uso industrial de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 o las cepas esencialmente derivadas se representa mediante la mezcla con masa a base de harina y el almacenamiento en un estado viable pero inactivo a temperaturas comprendidas entre 0 °C y 8 °C, con la propiedad de reactivarse para producir dióxido de carbono cuando se vuelva a un intervalo de temperatura óptimo para su crecimiento. La cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 y las cepas esencialmente derivadas se caracterizan por la presencia en su genoma de secuencias de nucleótidos que son únicas en términos de secuencia de bases, tamaño, número de copias o ubicación con respecto a las regiones colindantes, que son detectables y reproducibles mediante técnicas de biología molecular.

[0077] Según otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una masa refrigerada en forma sólida o fluida, en el que la preparación consiste en mezclar al menos agua, harina y levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* depositada con el número de acceso DSM 29004 en la ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, en el que dicha masa se envasa en un recipiente. De manera ventajosa, en una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención, dicha masa se envasa en un recipiente con una atmósfera modificada de nitrógeno (N₂) de 0 a 80 % y de dióxido de carbono (CO₂) de 0 a 60 %, o en un recipiente sellado que contenga atmósfera normal.

[0078] Las masas obtenidas de acuerdo con la presente invención pueden envasarse en bandejas termoselladas o no termoselladas, e incluso en la fecha de caducidad (es decir, después de 30 días) no se observa hinchamiento del envase, desarrollo de olores y sabor anormales ni formación de líquido dentro del envase. Una vez abierto el envase, el producto se deja reposar y fermentar a temperatura ambiente durante unos 20 minutos antes de estirar la masa. Este tiempo permite que la levadura presente en la masa recupere su vigor fermentativo y permite obtener un producto final caracterizado por una buena alveolación, agradabilidad y suavidad de la masa.

[0079] En una realización adicional más, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un medio que tiene una alta concentración de nitrógeno alfa-amino (también denominado en el presente documento "medio desechado"), que comprende las etapas de:

- a. cultivo de la cepa de levadura DSM 29004 en un medio de extracto de malta de cebada y de malta de trigo durante al menos 36 horas;
- b. separación de la levadura del medio, preferiblemente por filtración o por centrifugación;
- c. obtención de un medio que tiene una alta concentración de nitrógeno alfa-amino superior a 300 mg/l, en donde el nitrógeno alfa-amino no se agrega al medio, sino que resulta del crecimiento de la levadura.

[0080] Una característica del medio es que el DSM 29004, cultivado en el medio descrito en el párrafo anterior, libera durante la fermentación, preferiblemente: éster etílico del ácido octanoico, alcohol feniletílico, éster feniletílico del ácido acético, bencenoacetaldehído, 4-metil-2-heptanona, octanal, éster etílico del ácido nonanoico.

[0081] En los ejemplos se describe el uso del medio como suplemento para la masa y como suplemento para mejorar la fermentación de la masa de especies de bacterias del ácido láctico, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*. Preferiblemente, las bacterias del ácido láctico pertenecen al género *Pediococcus* spp.

[0082] A continuación, para ilustrar la presente invención, se describen ejemplos de realizaciones y procedimientos preferidos de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: procedimientos de análisis de la biodiversidad: ADN microsatélite

[0083] La cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* según se evidencia por el resultado positivo (Figura 1) de la PCR específica de la especie (Torriani y col., 2004). Además, para el mejor conocimiento del estado de la técnica, se caracteriza por un genotipo único descrito, en las formas preferidas, por:

- análisis del perfil de ADN microsatélite mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % en peso/volumen (Figura 2) de los productos de amplificación de la multiplexión por PCR *loci* SC8132X, YOR267C, SCPTSY7 (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008) y C5 (Legras y col., 2005). Los cebadores utilizados fueron: SC8132X FW y SC8132X RV cada uno a una concentración de 0,75 µM (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008); YOR267C FW y YOR267C RV cada uno a una concentración de 0,5 µM (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008); SCPTSY7 FW y SCPTSY7 RV a una concentración de 2,0 µM (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008) y finalmente los cebadores C5 FW y C5 RV a una concentración de 0,5 µM (Legras y col., 2005). La reacción se realizó en un volumen de 20 µl usando 1,5U de ADN polimerasa GoTaq (Promega) en un tampón 1x con adición de cloruro de magnesio (MgCl₂) a una concentración de 3,1 mM y nucleótidos trifosfato (dNTP), cada uno a una concentración de 0,4 mM. La amplificación se realizó en el instrumento Nexus Mastercycler Gradient (Eppendorf) con un programa térmico que consiste en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido de un ciclo a 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 30 segundos, repetido 34 veces, seguido de una última etapa de extensión a 72 °C durante 10 minutos.
- análisis de perfil de ADN microsatélite para *loci* YGL139W, YFR028C, YGL014W, YOL109W, YML091C, YLL049W, YBR240C, YDR160W, YPL009C, YOR267C, obtenido por amplificación en reacciones de PCR

separadas, utilizando cebadores descritos en la literatura (Richards y col., 2009), seguido de separación de los fragmentos en un capilar (Figura 3). El análisis del perfil en el capilar se realizó con el software Peak Scanner 2.0 con los siguientes parámetros: "tamaño estándar: GS500 (-250)" y "método de análisis: tamaño predeterminado - NPP".

[0084] Los *loci* de ADN microsatélite son unos pocos cientos de bases de secuencias dispersas en el genoma, que consisten en repeticiones en tándem de motivos cortos de 1-6 bases. También se conocen como secuencias simples repetidas o SSR. Estos *loci* se usan ampliamente como marcadores genéticos debido a su difusión, alto grado de polimorfismo y alta reproducibilidad y confiabilidad de sus ensayos de detección (Dutech y col., 2007). Estos son *loci* comunes entre eucariotas (levaduras, mohos, plantas y animales superiores) y rara vez están presentes en especies bacterianas. El polimorfismo ocurre esencialmente en dos niveles: presencia/ausencia de *loci* únicos y variaciones de longitud en cada *locus* debido al número de repeticiones de un solo motivo de repetición en tándem.

[0085] El análisis de ADN microsatélite consiste en la amplificación por PCR de los *loci* de interés. Los cebadores utilizados para la PCR están diseñados en regiones conservadas que flanquean el *locus* que se va a analizar. Si el *locus* está presente, una parte del ADN que contiene los motivos de repetición en tándem se obtiene como producto de PCR. La longitud del producto de PCR varía según la forma alélica presente en el genoma analizado. La presencia de varios *loci* y su tamaño se muestra mediante electroforesis en gel de agarosa. Si los cebadores utilizados están marcados con una molécula fluorescente, la ejecución se puede realizar en los capilares utilizados para la secuenciación de Sanger. Tanto en el gel de agarosa como en el análisis capilar, la migración de los productos de PCR muestra el tamaño de las bandas según su movilidad relativa. Se conocen docenas de *loci* diferentes en *Saccharomyces cerevisiae* (Legras y col., 2005). Algunos tienen un número limitado de formas alélicas (variantes del mismo *locus* observadas en cepas de la misma especie) y son poco discriminatorias, mientras que otros se caracterizan por un mayor número de formas alélicas y, por lo tanto, son más discriminatorias (Legras y col., 2005 Vaudano & Garcia-Moruno, 2008).

[0086] Según el mejor conocimiento del estado de la técnica, la base de datos más completa de perfiles de ADN microsatélite de cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* está disponible para consulta y consta de 246 perfiles generados por análisis capilar de 11 *loci* identificados en función de su mayor frecuencia alélica, con la excepción del *locus* mat a/mat α que solo tiene dos formas. La base de datos generada por Richards y colegas (2009) contiene perfiles de ADN de microsatélite de cepas aisladas en el campo y cepas comerciales de la industria del vino y otros sectores (Richards y col., 2009). En proyectos paralelos, se han desarrollado otros protocolos similares que confirmaron la alta capacidad de los *loci* de ADN microsatélite para diferenciar diferentes cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, no hay una base de datos disponible para consulta (Legras y col., 2007). La cepa DSM 29004 tiene un perfil único de ADN microsatélite, en comparación con todas las demás cepas descritas en la base de datos producida por Richards y col., 2009.

Ejemplo 2: Comparación del comportamiento de la cepa DSM 29004 con la cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*

[0087] Para diferenciar las propiedades de la cepa DSM 29004 de las cepas estándar de *Saccharomyces cerevisiae*, se utilizaron la cepa DSM 29004 de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa del tipo *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171^T para la preparación de dos masas de pizza idénticas que eran diferentes solamente para la cepa de levadura inoculada, y consistió en harina, agua (52 % en peso de la harina), aceite de oliva virgen extra (8,42 % en peso de la harina), sal (1 % en peso de la harina). Las dos cepas de levadura se agregaron al agua de amasado a una concentración de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ CFU/g. Las dos masas así obtenidas se envasaron en paquetes sellados en una atmósfera protectora (50 % de nitrógeno y 50 % de CO₂), se almacenaron a 6 °C y se controlaron a lo largo del tiempo.

Comportamiento de la cepa DSM 29004

[0088] Con respecto a la masa con la cepa DSM 29004, durante los primeros 15 días de almacenamiento refrigerado, se observó una disminución de aproximadamente 1 ciclo logarítmico en términos de CFU /g, de $1 \cdot 10^6$ CFU /g a $1 \cdot 10^5$ CFU/g, mientras que, durante el período restante, hasta 30 días de almacenamiento, se observó una ralentización de la disminución con un cambio de $1 \cdot 10^5$ CFU/g a $5 \cdot 10^4$ CFU/g. Durante estos 30 días, el paquete sellado nunca mostró signos de hinchazón o aumento de la presión interna.

[0089] La viabilidad y la capacidad de la levadura para dar lugar a masas bien estructuradas y alveoladas también se verificaron 15 días y 30 días después de la preparación.

[0090] En ambas pruebas, la masa se extrajo del paquete, se estiró en la bandeja para hornear y se dejó a temperatura ambiente (23 °C) durante 30 minutos.

[0091] En la prueba realizada el día 15, la altura de la masa cruda se triplicó con respecto a la altura original, demostrando una excelente actividad de la levadura. La masa fermentada durante 30 minutos aumentó aún más, aunque ligeramente, durante la cocción. El producto horneado mostró una alveolación grande y estructurada que era

bastante similar a la obtenida con una masa preparada el mismo día.

[0092] En una prueba realizada a los 30 días, la altura de la masa cruda aumentó a 2,5 veces su altura original, mostrando una actividad significativa de la levadura. La masa fermentada durante 30 minutos aumentó aún más, aunque ligeramente, durante la cocción. El producto cocido todavía mostraba una alveolación grande y estructurada que era comparable a la obtenida en la prueba realizada el día 15.

[0093] En ningún caso, el producto tenía olores extraños de sus ingredientes o colores inusuales.

Comportamiento del tipo de cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

[0094] Por el contrario, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171^T causó una hinchazón inaceptable del paquete sellado (y la rotura en muchos casos) incluso después de 3 días de almacenamiento a +6 °C, mostrando así una fuerte actividad de la levadura a la temperatura de 6 °C. Después de abrir el paquete, la masa tenía un olor y sabor anormales, caracterizados por un olor ácido y alcohólico. La estructura de la masa se debilitó hasta el punto de imposibilitar su estiramiento.

[0095] Después de estos tres días, hubo un aumento de 2 ciclos logarítmicos, de 1.10⁶ CFU/g a 1.10⁸ CFU/g de masa.

[0096] Por lo tanto, existe una clara diferencia en el comportamiento exhibido por la cepa DSM 29004 y la cepa tipo, con respecto tanto a la actividad de fermentación a 6 °C como a la calidad de la fermentación una vez que se extrajo la masa del paquete.

Ejemplo 3: preparación de una masa sólida para pizza

[0097] La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 se usa para la preparación de una masa sólida para pizza de acuerdo con la siguiente receta que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

INGREDIENTES	% INGREDIENTES
HARINA 60 %	60 %
AGUA 45 %	33 %
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA 2,9 %	3 %
SAL 1,5 %	1,8 %
LEVADURA 0,8 %	1 %
MALTA DE CEBADA 0,3 %	0,3 %
COADYUVANTE DE PROCESAMIENTO 0,5 %	0,3 %
LEVADURA DESACTIVADA 0,6 %	0,6 %

[0098] La levadura se inocula a una concentración de 5x10⁶ CFU /g de masa.

[0099] Esta masa se reparte en bolas que pesan aproximadamente 250 g.

[0100] Cada masa de bola se enfría a una temperatura de aproximadamente 0 °C/4 °C y se envasa en una bandeja termoformada en atmósfera modificada (50 % de N₂ y 50 % de CO₂). Luego, el paquete se almacena en un frigorífico a una temperatura de aproximadamente 6 °C durante 20 días. Después de veinte días a partir de la fecha de producción, la bola de masa se retira del paquete y se deja a temperatura ambiente (20-25 °C) durante unos 20 minutos. Después de dicho intervalo, la masa se extiende sobre una tabla de cortar enharinada hasta que alcanza el tamaño de una base redonda de unos 28 cm. Este último luego se transfiere a un papel a prueba de grasa y se adorna con pasta de tomate o tomates picados, queso mozzarella picado y otros ingredientes al gusto. Luego, la pizza se cocina en la parrilla central del horno precalentado a 230 °C y se pone en modo de ventilación durante 6-8 minutos hasta que el queso mozzarella se derrita por completo.

[0101] Esto da como resultado una pizza que tiene una miga suave y aveolada y un borde y corteza crujientes.

Ejemplo 4: preparación de una masa sólida para *focaccia* (pan plano)

[0102] La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 se usa para la preparación de una masa sólida de acuerdo con la siguiente receta que se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2

INGREDIENTES:	% INGREDIENTES
HARINA 60 %	60 %
AGUA 45 %	33 %
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA 2,9 %	3 %
SAL 1,5 %	1,8 %
LEVADURA 0,8 %	1 %
MALTA DE CEBADA 0,3 %	0,3 %
COADYUVANTE DE PROCESAMIENTO 0,5 %	0,3 %
LEVADURA DESACTIVADA 0,6 %	0,6 %

[0103] La levadura se inocula a una concentración de 5×10^6 CFU /kg de masa.

5 [0104] Esta masa se divide en bolas que pesan alrededor de 400 g.

[0105] Cada bola de masa se enfría a una temperatura de aproximadamente 0 °C y se empaqueta en una bandeja termoformada en atmósfera modificada (50 % de N₂ y 50 % de CO₂). Luego, el paquete se almacena en un frigorífico a una temperatura de aproximadamente 6 °C durante 20 días.

10 [0106] Después de veinte días a partir de la fecha de producción, la bola de masa se retira del paquete y se deja a temperatura ambiente (20-25 °C) durante aproximadamente 20 minutos. Después de dicho intervalo, la masa se extiende sobre una tabla de cortar enharinada hasta que alcanza el tamaño de una bandeja para hornear (30x40 cm). Esta último se transfiere a un papel a prueba de grasa, y se perfora con un tenedor para evitar la fermentación excesiva durante la cocción. La superficie de la base luego se engrasa con aproximadamente 3 cucharadas de aceite de oliva virgen extra y sal al gusto. Luego, el pan plano se cocina en la parrilla mediana del horno, se precalienta a 200 °C y se pone en modo de ventilación, durante aproximadamente 14 minutos.

15 [0107] Esto da como resultado un pan plano que luce bien elevado y se caracteriza por una miga suave y alveolada con borde y corteza crujientes.

Ejemplo 5: preparación de una masa sólida para rectángulos de masa inflada frita

25 [0108] La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 se usa para la preparación de una masa sólida para rectángulos de masa inflada frita de acuerdo con la siguiente receta que se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3

INGREDIENTES:	% INGREDIENTES
HARINA 60 %	60 %
AGUA 45 %	33 %
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA 2,9 %	3 %
SAL 1,5 %	1,8 %
LEVADURA 0,8 %	1 %
MALTA DE CEBADA 0,3%	0,3 %
COADYUVANTE DE PROCESAMIENTO 0,5%	0,3 %
LEVADURA DESACTIVADA 0,6%	0,6 %

[0109] La levadura se inocula a una concentración de 5×10^6 CFU /g de masa.

30 [0110] Esta masa se divide en bolas que pesan alrededor de 400 g.

[0111] Cada bola de masa se enfría a una temperatura de aproximadamente 0 °C y se empaqueta en una bandeja termoformada en atmósfera modificada (50 % de N₂ y 50 % de CO₂). Luego, el paquete se almacena en un refrigerador a una temperatura de aproximadamente 6 °C durante 20 días.

35

[0112] Después de veinte días a partir de la fecha de producción, la bola de masa se retira del paquete y se deja a temperatura ambiente (20-25 °C) durante aproximadamente 20 minutos. Después de ese tiempo, la masa se extiende sobre una tabla de cortar enharinada para obtener una masa enrollada con un grosor de 2-3 mm. La masa enrollada se corta en rectángulos de aproximadamente 10 cm x 10 cm. Por separado, se precientan 500 ml/1L de aceite adecuado para freír (aceite de oliva o aceite de cacahuete) en una sartén. Una vez que el aceite está caliente, los rectángulos de la masa se sumergen poco a poco durante unos 30 segundos. Los rectángulos hinchados se drenan individualmente en toallas de papel.

[0113] Se obtiene un producto frito que se caracteriza por una fuerte fermentación de la masa.

Ejemplo 6: preparación de una masa fluida para la producción de una pizza

[0114] La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 se usa para la preparación de una masa fluida para la producción de una pizza de acuerdo con la siguiente receta que se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4

INGREDIENTES:	% INGREDIENTES
HARINA TIPO 0	48,9 %
AGUA 45 %	45 %
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA 2,9 %	2,9 %
SAL 1,5 %	1,5 %
LEVADURA 0,8%	0,8 %
COADYUVANTE DE PROCESAMIENTO 0,5 %	0,5 %
EXTRACTO DE MALTA 0,4 %	0,4 %

[0115] La levadura se inocula a una concentración de aproximadamente 5×10^6 CFU /g de masa.

[0116] Dicha masa fluida se divide en paquetes de 600 g y cada paquete se sella en atmósfera modificada (50 % de N₂ y 50 % de CO₂). El paquete se almacena en un frigorífico a una temperatura entre 0 °C y 8 °C, preferiblemente 6 °C durante 20 días.

[0117] Después de veinte días a partir de la fecha de producción, el paquete se abre y se vierten 600 g de masa líquida en una bandeja para hornear bien aceitada con una cucharada de aceite de oliva. La masa se distribuye bien por todo el espacio disponible de la bandeja y se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. La bandeja se puede cubrir con una película de teflón para evitar la formación de películas de superficie. Después de dos horas, la base blanca se cocina durante aproximadamente 16 minutos a 200 °C en un horno en modo ventilado. Después de cocinar, el producto se cubre con 100 g de salsa de tomate y 100 g de queso mozzarella cortado en trozos. En este punto, el producto se cocina durante 8-10 minutos a 200 °C en un horno en modo ventilado.

[0118] Se obtiene una pizza con una miga suave y alveolada y un borde y una corteza crujientes.

Ejemplo 7: prueba de panel para la verificación del nivel de aceptación general del producto

[0119] Los productos horneados obtenidos siguiendo las recetas y métodos de preparación anteriores se someten a una "prueba de panel" para confirmar el hecho de que dichos productos se caracterizan por una buena alveolación y, al mismo tiempo, por la suavidad y la textura crujiente de la masa.

[0120] La prueba de panel o análisis sensorial es una herramienta que permite, debido al uso de técnicas y procedimientos estandarizados, la medición y evaluación objetiva de todas las características de un producto alimenticio percibido por los cinco sentidos humanos. Su aplicación sistemática, combinada con análisis químicos, físicos y microbiológicos, puede identificar un producto de calidad satisfactorio para las preferencias gustativas de los consumidores.

[0121] También se realizó una prueba de panel de confirmación (Figura 4) para confirmar la satisfacción general del producto desde el punto de vista organoléptico. Los productos que se probaron son bases blancas obtenidas de masa sólida, fermentadas previamente durante 30 minutos durante la fase de producción, envasadas en una atmósfera protectora (50 % N₂ y 50 % CO₂) y almacenadas durante 21 días a +8 °C La preparación del producto terminado se realizó siguiendo los procedimientos indicados anteriormente.

[0122] Las ventajas conseguidas por el producto de la presente invención son evidentes a partir de la descripción

detallada y de los ejemplos anteriores. En particular, este producto ha demostrado ser, de manera sorprendente y ventajosa, adecuado para la preparación de una masa sólida o fluida que puede almacenarse a temperaturas inferiores a 8 °C, incluso durante más de 20 días, sin cambios cualitativos de la masa y del paquete y que permite, una vez que se cambia a temperatura ambiente, obtener productos de panadería caracterizados por un desarrollo óptimo.

Ejemplo 8: Comparación genotípica de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

[0123] La comparación de ADN microsatélite de las siguientes cepas de levadura se realizó con el fin de verificar si existe una superposición entre la cepa DSM 29004 de acuerdo con la presente invención y las cepas del estado de la técnica.

[0124] Cepas analizadas: *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004, *S. cerevisiae* NCIMB 40611; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40612; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40613; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40614; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40615; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40328; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40329; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40330; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40331; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40332 y *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171^T.

[0125] La cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004, aislada de una masa fermentada espontáneamente proveniente de Italia, se caracteriza por un genotipo único descrito, en las formas preferidas, por:

análisis de perfil de ADN microsatélite mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % en peso (Figura 2) de productos de amplificación de PCR multiplex que amplifican *loci* SC8132X, YOR267C, SCPTSY7 (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008) y C5 (Legras y col., 2005). Los cebadores utilizados fueron: SC8132X FW y SC8132X RV cada uno a una concentración de 0,75 µM (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008); YOR267C FW y YOR267C RV cada uno a una concentración de 0,5 µM (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008); SCPTSY7 FW y SCPTSY7 RV a una concentración de 2,0 µM (Vaudano & Garcia-Moruno, 2008) y finalmente los cebadores C5 FW y C5 RV a una concentración de 0,5 µM (Legras y col., 2005). La reacción se realizó en un volumen de 20 µl usando 1,5U de ADN polimerasa GoTaq (Promega) en un tampón 1x con adición de cloruro de magnesio (MgCl₂) a una concentración de 3,1 mM y nucleótidos trifosfato (dNTP), cada uno a una concentración de 0,4 mM. La amplificación se realizó en el instrumento Nexus Mastercycler Gradient (Eppendorf) con un programa térmico que consiste en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido de un ciclo a 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 30 segundos, repetido 34 veces, seguido de una última etapa de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

[0126] Los resultados indican claramente que DSM 29004 es una nueva cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* con características mejoradas, que se caracteriza por un genotipo único como se puede ver en el análisis de perfil del ADN de microsatélite como se muestra (Figura 2b).

[0127] Más en detalle, la cepa DSM 29004 es diferente de las otras cepas indicadas en el estado de la técnica debido a tres bandas específicas (banda A, banda B y banda C) en el patrón de ADN microsatélite, comprendidas en el intervalo entre 350 pb y 500 pb.

Ejemplo 9: comparación de los compuestos volátiles liberados por la cepa DSM 29004 de *Saccharomyces cerevisiae*, y las otras cepas, durante la producción en medio a base de melaza mediante análisis SPME GC-MS

[0128] Cepas analizadas: *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004, NCIMB 40611; NCIMB 40612; NCIMB 40613; NCIMB 40614; NCIMB 40615, NCIMB 40328; NCIMB 40329; NCIMB 40330; NCIMB 40331; NCIMB 40332 and CBS1171^T.

[0129] Todas las cepas de *S. cerevisiae* que tienen el fenotipo LTi descrito en el estado de la técnica se compararon así con la cepa de *S. cerevisiae* DSM 29004 según la presente invención, analizando la producción de aroma, para verificar las diferencias de actividad fenotípica entre las cepas.

[0130] Las cepas se cultivaron en medio YPD (Tabla 5). Un cultivo de cada cepa en la fase exponencial media se diluyó para alcanzar una concentración de 0,1 OD en la longitud de onda de 600 nm. El medio "a base de melaza" (Tabla 6) se inoculó independientemente con 100 µl de dicha suspensión de células de levadura a la concentración de 0,1 OD y se incubó 72 h a 27 °C.

[0131] Las siguientes tablas muestran la lista de los componentes y su concentración en los medios utilizados para cultivar las cepas de levaduras en cultivo discontinuo.

Tabla 5. Medio de peptona y dextrosa de extracto de levadura (YPD):

INGREDIENTES:	CONCENTRACIÓN
EXTRACTO DE LEVADURA	10,0 g/l
PEPTONA	20,0 g/l
DEXTROSA	20,0 g/l

Tabla 6. Medio a base de melaza para cultivo discontinuo (MM):

INGREDIENTES:	CONCENTRACIÓN
MELAZA DE REMOLACHA	100,0 g/l
(NH ₄)H ₂ PO ₄	4,35 g/l
(NH ₄)Cl	2,02 g/l
K ₂ HPO ₄	1,0 g/l
CITRATO DE SODIO	2,0 g/l
BIOTINA	0,05 mg/l
PANTOTENATO DE CALCIO	50,0 mg/l
INOSITOL	250,0 mg/l

- 5 **[0132]** Al final de dicho período, se transfirieron 3 ml de caldo de cultivo a viales estériles (10 ml de capacidad) para el análisis de compuestos volátiles. Se agregaron 10 µl de un stock de 1000 ppb de patrón de referencia interno (4-metilpentanol) a cada vial antes de sellarlo. El análisis SPME GC-MS se realizó en cada muestra. Las condiciones experimentales son las descritas por Montanari y col. (2014).
- 10 **[0133]** Los perfiles aromáticos obtenidos para cada cepa se indican en la Tabla 7, en la que cada resultado es el promedio de tres mediciones. Cada resultado se expresa como la relación entre el área del pico y el área del estándar de referencia.

Tabla 7

ÁREA/ ÁREA estándar	acetato de etilo	Etanol	ácido acético 2metil-propil éster	1-propanol	éster etílico del ácido butanoico	2-metil, 1- propanol	acetato de 3- metil 1-butanol	éster etílico del ácido pentanoico
DSM29004	0,551	13,009	0,000	0,077	0,210	0,285	0,439	0,096
CBS1171	0,671	13,692	0,042	0,017	0,189	0,513	0,850	0,026
NCIMB40611	0,881	12,104	0,017	0,081	0,365	0,294	0,585	0,106
NCIMB40612	0,989	12,370	0,030	0,118	0,393	0,365	0,698	0,121
NCIMB40613	0,584	14,192	0,000	0,117	0,253	0,199	0,518	0,015
NCIMB40614	0,420	8,339	0,000	0,035	0,126	0,143	0,294	0,071
NCIMB40615	0,694	11,334	0,043	0,076	0,305	0,517	0,676	0,093
NCIMB40328	0,270	7,667	0,022	0,032	0,099	0,211	0,606	0,027
NCIMB40329	1,343	15,719	0,012	0,071	0,318	0,228	0,531	0,088
NCIMB40330	1,493	28,756	0,011	0,110	0,327	0,253	0,660	0,050
NCIMB40331	0,900	14,283	0,020	0,082	0,255	0,365	0,550	0,103
NCIMB40332	1,013	15,476	0,054	0,067	0,269	0,265	0,568	0,104

Tabla 7 (continuación)

ÁREA/ ÁREA estándar	3metil butanol	4metil 2heptanona	éster etílico del ácido hexanoico	octanal	3-hidroxi- 2-butanona	éster etílico del ácido heptanoico	éster etílico del ácido octanoico	decanal
DSM29004	2,947	0,013	0,515	0,000	0,937	0,133	1,613	0,087
CBS1171	2,917	0,024	0,495	0,118	0,350	0,112	3,547	0,074
NCIMB40611	3,388	0,096	0,707	0,368	0,000	0,090	1,765	0,333
NCIMB40612	3,653	0,067	0,597	0,321	0,000	0,118	3,130	0,271
NCIMB40613	3,525	0,054	0,728	0,490	0,000	0,124	3,089	0,121
NCIMB40614	1,651	0,079	0,313	0,000	1,015	0,082	1,574	0,212
NCIMB40615	3,169	0,044	0,597	0,315	0,192	0,082	2,247	0,296
NCIMB40328	1,430	0,093	0,371	0,442	0,000	0,101	1,926	0,181
NCIMB40329	2,905	0,093	0,831	0,278	0,000	0,158	2,262	0,204
NCIMB40330	3,366	0,093	0,986	0,551	0,000	0,155	3,309	0,210
NCIMB40331	3,208	0,055	0,554	0,607	0,000	0,111	1,474	0,317
NCIMB40332	3,241	0,064	0,725	0,000	0,766	0,130	2,063	0,241

Tabla 7 (continuación)

ÁREA/ ÁREA estándar	éster etílico del ácido nonanoico	benzaldehído	ácido butanoico	éster etílico del ácido decanoico	éster metílico del ácido benzoico	ácido 3metil butanoico	etil-9- decanoato	ácido hexanoico
DSM29004	0,187	0,203	0,295	0,958	0,344	0,078	0,442	0,427
CBS1171	0,143	0,250	0,318	1,155	0,238	0,000	2,631	0,574
NCIMB40611	0,115	0,132	0,218	1,113	0,262	0,027	0,790	0,203
NCIMB40612	0,375	0,127	0,242	1,020	0,323	0,000	0,644	0,297
NCIMB40613	0,215	0,000	0,288	1,511	0,319	0,000	0,696	0,311
NCIMB40614	0,237	0,034	0,184	0,731	0,264	0,000	0,374	0,199
NCIMB40615	0,251	0,045	0,246	0,498	0,291	0,060	0,468	0,268
NCIMB40328	0,092	0,252	0,323	0,428	0,365	0,000	0,115	0,348
NCIMB40329	0,289	0,101	0,389	0,952	0,486	0,129	0,549	0,521
NCIMB40330	0,131	0,192	0,595	1,447	0,585	0,171	2,306	0,504
NCIMB40331	0,258	0,478	0,341	1,207	0,446	0,000	0,651	0,393
NCIMB40332	0,232	0,220	0,303	1,134	0,407	0,000	0,558	0,416

Tabla 7 (continuación)

ÁREA/ ÁREA estándar	Alcohol fenilético	ácido octanoico	ácido nonanoico	éster etílico del ácido hexadecanoico	ácido n-decanoico	9-hexadecenoato de etilo	ácido dodecanoico	éster metílico del ácido octadecenoico	ácido tetradecanoico
DSM29004	0,931	0,963	0,209	0,342	0,292	0,300	0,104	0,123	0,250
CBS1171	1,351	1,828	0,145	0,000	0,924	0,101	0,150	0,000	0,039
NCIMB40611	0,462	0,451	0,040	0,000	0,101	0,038	0,000	0,000	0,044
NCIMB40612	0,320	0,686	0,083	0,000	0,263	0,027	0,030	0,000	0,107
NCIMB40613	0,324	1,207	0,194	0,000	0,569	0,024	0,000	0,000	0,048
NCIMB40614	0,153	0,445	0,043	0,000	0,057	0,000	0,007	0,000	0,040
NCIMB40615	0,351	0,486	0,038	0,000	0,046	0,037	0,000	0,000	0,014
NCIMB40328	0,408	0,674	0,081	0,000	0,529	0,000	0,062	0,000	0,178
NCIMB40329	0,407	1,019	0,111	0,000	0,322	0,030	0,069	0,000	0,179
NCIMB40330	0,569	1,745	0,189	0,000	0,638	0,058	0,209	0,000	0,369
NCIMB40331	0,986	0,824	0,084	0,000	0,244	0,097	0,106	0,000	0,162
NCIMB40332	0,875	1,123	0,134	0,000	0,561	0,082	0,137	0,000	0,133

[0134] Se realizó un análisis de componentes principales para verificar una discriminación adicional de las cepas. Se observó que los dos primeros componentes explican más del 50 % de la varianza total y en base a la proyección de las dos primeras variables, las cepas se colocaron en el gráfico de proyección como se muestra en la Figura 5.

5 Resultados:

[0135] La Figura 5 muestra que las cepas NCIMB del estado de la técnica están todas agrupadas entre sí (con la excepción de NCIMB40330, que está en la parte inferior (negativa) del gráfico. Ambas cepas CBS1171^T y DSM29004 están distantes en esta proyección y están en el lado positivo del eje y.

[0136] Según la Figura 5, las posiciones de las cepas en el gráfico se deben principalmente a las siguientes variables: 3-hidroxi-2-butanona, éster etílico del ácido hexadecanoico, 9-hexadecanoato de etilo y éster metílico del ácido octadecanoico (Tabla 7).

[0137] Las variables éster etílico del ácido hexadecanoico y éster metílico del ácido octadecanoico parecen producirse únicamente por la cepa de acuerdo con la presente invención. De hecho, solo la cepa *S.cerevisiae* DSM29004 produce los compuestos volátiles: éster etílico del ácido hexadecanoico y éster metílico del ácido octadecanoico.

[0138] Estos compuestos se caracterizan por un aroma afrutado y suave.

[0139] La presencia de estos compuestos hace que el DSM 29004, cultivado en un medio a base de melaza, libere un aroma más agradable que las cepas de levadura habituales que crecen en el mismo medio.

Ejemplo 10: análisis de compuestos volátiles liberado por la cepa DSM 29004 de *Saccharomyces cerevisiae*, en Medio 4 (M4) por SPME GC-MS.

[0140] El análisis se realizó como se explica en el Ejemplo 9, inoculando la cepa DSM 29004 en Medio 4 (M4) en lugar de MM. La composición de M4, que se basa en el extracto de malta de cebada y el extracto de malta de trigo, se describe en la Tabla 8.

Tabla 8 Medio 4 (M4), hecho de malta de cebada y malta de grano para cultivo discontinuo

INGREDIENTES:	CONCENTRACIÓN
EXTRACTO DE MALTA DE CEBADA	55,0 g/l
EXTRACTO DE MALTA DE TRIGO	35,0 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,05 g/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,15 g/l
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	15,0 mg/l
FeCl ₃ x 6H ₂ O	5,0 mg/l
MnSO ₄ x 2H ₂ O	0,5 mg/l
BIOTINA	0,05 mg/l
PANTOTENATO DE CALCIO	2,0 mg/l
INOSITOL	300,0 mg/l
ÁCIDO NICOTÍNICO	4,0 mg/l
TIAMINA-HCl	0,7 mg/l
PIRIDOXINA-HCl	0,7 mg/l
RIBOFLAVINA	0,7 mg/l
ÁCIDO FÓLICO	0,2 mg/l

[0141] La cepa DSM 29004 se incubó durante 72 horas en el medio M4 y produjo un perfil típico de compuestos volátiles constituidos por las treinta moléculas indicadas en la Tabla 9. El experimento se repitió dos veces y los datos se expresan como el valor medio de la relación de cada área de pico y área de pico estándar. El cromatograma de una de las repeticiones se muestra en la Figura 6.

Tabla 9. Cuantificación de los treinta compuestos volátiles producidos por DSM 29004 después del crecimiento en M4 durante 72 horas.

ÁREA/ÁREA estándar	DSM 29004
Acetato de etilo	0,530
3metil butanal	0,000
Etanol	18,039
1 propanol	0,175
2-metil 1-propanol	0,286
3metil, acetato de 1butanol	0,566
2metil 2 heptanol	0,166
3-metil 1 butanol	3,067
4-metil 2-heptanona	0,102
éster etílico del ácido hexanoico	0,335
Octanal	0,157
3hidroxi-2butanona	0,090
éster etílico del ácido heptanoico	0,081
Nonanal	0,219
éster etílico del ácido octanoico	2,412
éster etílico del ácido nonanoico	0,516
benzaldehído	0,034
éster etílico del ácido decanoico	0,680
éster etílico del ácido undecanoico	0,209
bencenoacetaldehído	0,878
etil-9-decenoato	0,271
éster 2-feniletílico del ácido acético	0,194
ácido hexanoico	0,101
éster etílico del ácido dodecanoico	0,000
alcohol feniletílico	4,080
ácido octanoico	0,737
ácido nonanoico	0,035
ácido n-decanoico	0,106
9-hexadecenoato de etilo	0,506

[0142] Al comparar la Tabla 9 y la Tabla 7, se pueden resaltar las diferencias entre los perfiles de aroma de DSM 29004 cultivados en medios M4 y MM. Las diferencias más relevantes se evidencian en la concentración de etanol, mayor en M4, debido a la mayor concentración de azúcar, lo que favorece la vía de fermentación. Sin embargo, la concentración de algunas moléculas con un impacto relevante en el sabor general es mayor después del crecimiento de DSM 29004 en M4. De hecho, los siguientes compuestos resultaron en una mayor proporción en M4: éster etílico del ácido octanoico (2,41 vs. 1,61), alcohol feniletílico (4,08 vs. 0,93), ácido feniletílico del ácido acético (0,19 vs. 0), bencenoacetaldehído (0,88 vs. 0), 4-metil-2-heptanona (0,10 vs. 0,01), octanal (0,15 vs. 0), éster etílico del ácido nonanoico (0,52 vs. 0,19). Todos estos compuestos tienen un fuerte impacto en el sabor, mejorando los componentes afrutados y florales (como rosas) del sabor y reduciendo los componentes picantes del sabor, que son molestos para el gusto humano. Los componentes picantes del sabor, en cambio, son típicos de la fermentación de levadura cultivada en un medio a base de melaza.

Ejemplo 11: procedimiento para inducir la expresión de enzimas en DSM 29004 para metabolizar la maltosa y los compuestos relacionados con el extracto de malta.

[0143] Tres muestras de ARN total se purifican mediante tres cultivos de *S. cerevisiae* DSM 29004 cultivados durante 18 horas a 27 °C en YPD (Tabla 5), MM (Tabla 6) y M4 (Tabla 8) a través de ZR ARN Fungal/Bacterial MiniPrep (ZymoResearch). Se procesa ARN total de alta calidad (valor RIN >8,0). El ARNm se purifica primero por captura de poliA, mientras que, para la muestra bacteriana, el ARN total se somete primero a agotamiento de ARNr. El ARNm purificado se fragmenta y se convierte en ADNc bicatenario. Los adaptadores de ADN con códigos de barras específicos de la muestra se ligan y se realiza una amplificación por PCR. El "método dUTP" se utiliza para generar bibliotecas de secuencias de ARNm específicas de cadena, incluyendo los códigos de barras, y que son compatibles con la secuenciación de una sola lectura o de extremos emparejados. Se utiliza el kit de preparación de la biblioteca RNA-seq de Illumina TruSeq. La biblioteca se selecciona en función del tamaño utilizando perlas magnéticas, lo que da como resultado un promedio en bibliotecas con un tamaño de inserto en el intervalo aproximado de 100-400 pb.

[0144] Las lecturas de secuencia se filtran y se recortan adicionalmente en función de las puntuaciones de calidad de Phred. Las lecturas filtradas/recortadas se alinean contra la secuencia de referencia de la cepa *S. cerevisiae* S288c utilizando el software CLCbio "RNA-Seq". También los valores de expresión (normalizados) se calculan y se comparan entre las muestras. El control de calidad se realiza mediante el análisis de diagrama de caja, el análisis de componentes principales (PCA) y el agrupamiento jerárquico de los valores de expresión normalizados.

[0145] Los datos reflejan en la muestra de *S. cerevisiae* DSM 29004 cultivada en M4 cuando se comparan con los medios YPD y MM una expresión modulada de los genes de la familia de las glucosidasas y los genes relacionados con el metabolismo de la maltosa, en particular los genes *mal11*, *mal11.3*, *mal11.5*, *mal12*, *mal13*, *mal13.3*, *mal13.5*, *mal31*, *mal31.3*, *mal31.5*, *mal32*, *mal33*, *mal33.3*, *mal33.5*.

[0146] Estos datos muestran que el medio M4 mejora la expresión de los genes relacionados con la fermentación de la masa en *S. cerevisiae* DSM 29004, ya que la maltosa es el azúcar presente principalmente en la masa de productos horneados. Así, la cepa DSM 29004, cultivada en un medio M4, y una vez en una masa de producto horneada, utilizará la maltosa de manera más eficaz y mostrará más celeridad, más rapidez y más vigor que la cultivada en medio a base de melaza, favoreciendo así la fermentación de la masa. Esta característica de una mejor fermentación de la cepa DSM 29004 cultivada en medio M4 representa una ventaja constante en el uso de cepas Lti, ya que se sabe que estas cepas se muestran, incluso a temperaturas que generalmente son óptimas para la fermentación de *S. cerevisiae*, una actividad metabólica más baja, y esto generalmente resulta en una fermentación insuficiente o un tiempo demasiado largo para una fermentación decente.

Ejemplo 12: baja producción de dióxido de azufre en el medio según la invención por la cepa DSM 29004 y su relevancia para la interacción con bacterias del ácido láctico

[0147] El medio M4 a base de extracto de malta de cebada y extracto de malta de trigo se prepara esterilizando en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, una solución de 55 g/l de extracto de malta de cebada y 35 g/l de extracto de malta de trigo y luego añadiendo los otros componentes esterilizados de la siguiente manera: en autoclave, en el caso de sales y por filtración en el caso de vitaminas.

[0148] Un cultivo exponencial medio en YPD de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004, se normaliza a una concentración de 0,1 OD (longitud de onda de 600 nm) y se inoculan 2 ml en 100 ml del medio y se cultivan a 27 °C en un agitador durante 36 horas. La cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004 muestra una producción de dióxido de azufre inferior a 10 mg/l, que es compatible con el uso del medio desechado como suplemento para mejorar el crecimiento de bacterias del ácido láctico en una masa fermentada. De hecho, el dióxido de azufre, generalmente es producido por la levadura durante la fermentación. La presencia de dióxido de azufre inhibe el crecimiento de las bacterias del ácido láctico, por lo tanto, no es ventajosa en la fermentación de la masa (Ejemplo 11) y representaría un obstáculo insuperable en el caso de que el medio desechado se agregara a la masa junto con la cepa de levadura como suplemento. En su lugar, el medio desechado después del crecimiento de DSM29004, que no muestra presencia de dióxido de azufre, es adecuado para ser añadido a una masa como suplemento, aprovechando así su capacidad mencionada anteriormente para mejorar el crecimiento de las bacterias del ácido láctico.

Ejemplo 13: altas concentraciones de nitrógeno alfa-amínico disponibles en el medio de acuerdo con la invención por la cepa DSM 29004 y su relevancia para la interacción con bacterias del ácido láctico

[0149] El medio M4 a base de extracto de malta de cebada y extracto de malta de trigo se prepara esterilizando en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, una solución de 55 g/l de extracto de malta de cebada y 35 g/l de extracto de malta de trigo y luego añadiendo los otros componentes esterilizados de la siguiente manera: en autoclave, en el caso de sales y por filtración en el caso de vitaminas.

[0150] Un cultivo exponencial medio en YPD de las cepas *Saccharomyces cerevisiae* DSM 29004, *S. cerevisiae* NCIMB 40611; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40612; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40613; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40614; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40615; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40328; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40329; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40330; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40331; *Saccharomyces cerevisiae* NCIMB 40332 *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171^T, se normalizaron como se describe en el Ejemplo 12 e inocularon en 100 ml del medio, luego se cultivaron a 27 °C en un agitador durante 36 horas.

[0151] El medio desechado al final de la fermentación en el caso de la cepa DSM 29004 muestra una concentración notable de nitrógeno alfa-amínico de 465 mg/l (Tabla 10), mientras que el promedio de todas las demás cepas analizadas es de 133 mg/l. Esta concentración 3 veces mayor de nitrógeno alfa-amínico confiere al medio desechado un valor añadido como suplemento para el crecimiento de bacterias del ácido láctico. De hecho, el nitrógeno alfa-amínico es una fuente de factores esenciales para el crecimiento de microorganismos, tales como las bacterias del ácido láctico, especialmente las bacterias del ácido láctico que están bien adaptadas a la masa y la masa fermentada. La presencia de bacterias del ácido láctico es esencial para mejorar la textura de la masa y los sabores, dándole una fragancia más natural (véase el Ejemplo 14).

Tabla 10. Concentración del nitrógeno alfa-amínico en el medio desechado obtenido después del crecimiento de DSM 29004 y las cepas de levadura indicadas en el estado de la técnica

CEPA CULTIVADA EN MEDIO M4	NITRÓGENO ALFA-AMÍNICO (mg/l)
NCIMB 40328	148
NCIMB 40329	108
NCIMB 40330	<150
NCIMB 40331	109
NCIMB 40332	112
NCIMB 40611	<150
NCIMB 40612	123
NCIMB 40613	143
NCIMB 40614	18
NCIMB 40615	125
CBS 1171	110
DSM 29004	465

Ejemplo 14: efecto del extracto de levadura fresca de DSM 29004 sobre *Lactobacillus sanfranciscensis* y comparación del efecto del Medio 4 desechado al final de la cepa DSM 29004 y producción de CBS 1171^T sobre bacterias del ácido láctico

[0152] Se sabe que *Lactobacillus sanfranciscensis* requiere extracto de levadura fresca como suplemento en el medio DSM 225 (conocido también como "Dough Like Medium") producido de acuerdo con el protocolo publicado por DSMZ (Tabla 11). *Lactobacillus sanfranciscensis* es una de las bacterias más utilizadas para la preparación de masas fermentadas, debido a su capacidad para dar a la masa sabores agrios típicos de las masas hechas a mano a la antigua. Se preparó un extracto de levadura fresca de la cepa DSM 29004 y se usó para cultivar *Lactobacillus sanfranciscensis* LMG17498. El crecimiento fue bien promovido por el extracto fresco de DSM 29004 (Figura 7a).

Tabla 11. Composición del medio DSM 225, también conocido como "Dough Like Medium".

INGREDIENTES:	CONCENTRACIÓN
MALTOSA	20 g/l
EXTRACTO DE LEVADURA	3,0 g/l
EXTRACTO FRESCO DE LEVADURA	15 ml/l
TWEEN 80	0,3 g/l
CASEÍNA PEPTONA	6,0 g/l

[0153] La potencialidad del medio M4 desechado recuperado después de la recolección de las células de levadura de la cepa DSM 29004 como posible suplemento para mejorar el crecimiento de las bacterias del ácido láctico en una masa fermentada se evaluó mediante el análisis de la cinética del crecimiento en medio líquido MRS (Oxoid). El medio MRS se preparó de acuerdo con las instrucciones del productor, excepto por el uso de 9/10 de agua para disolver el polvo. La solución se esterilizó en autoclave, luego en cada botella/vial se añadió 1/10 de volumen del medio M4 desechado en el que se cultivaron la cepa DSM 29004 y CBS 1171^T. Los medios desechados se agregaron por filtración con membranas caracterizadas por un tamaño de mineral de 0,45 µm. La cinética de crecimiento se monitorizó midiendo la densidad óptica del tubo a 600 nm.

[0154] En el ensayo, se usaron las cepas *Lactobacillus brevis* DSM 20054^T, *Lactobacillus fermentum* LMG 6902^T, *Lactobacillus plantarum* DSM 20174^T, *Leuconostoc mesenteroides* LMG 6893^T, *Pediococcus pentosaceus* LMG 11488^T y *Pediococcus acidilactici*. Los datos para todas las especies mencionadas se indican en la Figura 7.

[0155] Más en detalle, un cultivo exponencial medio en MRS de cada cepa se normalizó a una concentración de 0,1 OD a 600 nm de longitud de onda y 10 µl se inocularon en MRS como control negativo, en MRS suplementado con el medio M4 desechado del cultivo de DSM 29004 (MRS + M4 DSM29004) y con medio M4 desechado de CBS1171^T (MRS + M4 CBS1171). La cinética de crecimiento de estos cultivos bacterianos se monitorizó durante 48 horas midiendo la concentración celular con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (Figuras 7b, 7c, 7d, 7e, 7f, 7g).

[0156] La calidad de los productos a base de cereales está influenciada por las funciones de varios ingredientes, tales como la masa fermentada.

[0157] La masa fermentada es una mezcla de harina y agua que se fermenta mediante una microflora compuesta por asociaciones estables de levaduras y bacterias del ácido láctico (LAB).

[0158] Estas LAB son principalmente cepas heterofermentativas, que elaboran ácido láctico y ácido acético en la mezcla, y por lo tanto dan como resultado un sabor amargo del producto final. La masa fermentada desempeña un papel importante en la preparación de la masa de pan para favorecer las propiedades tecnológicas (por ejemplo, mejor maquinabilidad de la masa), propiedades nutricionales (por ejemplo, mediante hidrólisis de fitato), propiedades organolépticas (por ejemplo, volumen de pan, textura de miga y un sabor único), y mantenimiento de las propiedades (vida útil).

[0159] Las LAB y las levaduras a menudo se asocian en la masa fermentada. La relación LAB: levadura en masa fermentada es generalmente de 100:1. Mientras que, en la mayoría de los alimentos fermentados, las LAB homofermentativas desempeñan un papel importante, las LAB heterofermentativas predominan en la masa fermentada, especialmente cuando se prepara de forma tradicional. De hecho, el ácido acético, un importante producto final de la heterofermentación, desempeña un papel importante en el sabor de la masa fermentada.

[0160] Las LAB son un grupo importante de cultivos iniciadores industriales, aplicados en la producción de alimentos fermentados.

[0161] Las LAB contribuyen a la mejora de las propiedades de sabor de los alimentos fermentados, así como a sus bioconservantes y a su seguridad microbiana.

[0162] La actividad metabólica de las LAB durante la fermentación mejora la propiedad de la masa, la textura y el sabor; retrasa el proceso de estancamiento y evitar que los productos con levadura tengan moho y se echen a perder por las bacterias. Las LAB contribuyen al valor nutricional y a la salubridad de los productos.

[0163] La importancia de las interacciones sinérgicas entre lactobacilos y levaduras se basa en el metabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos y la producción de dióxido de carbono.

[0164] Producen principalmente ácido L-láctico y ácido acético con una menor cantidad de otros ácidos tales como el ácido cítrico y los ácidos málicos.

[0165] Muchas propiedades reológicas de la masa dependen de las actividades metabólicas de sus LAB residentes: fermentación láctica, fermentación acética, proteólisis, síntesis de compuestos volátiles, actividad anti-moho y anti-viscosidad.

[0166] Las actividades metabólicas de la fermentación de las LAB mejoran las propiedades de la masa, la textura y el sabor del pan y retrasan el proceso de estancamiento del pan.

[0167] Durante mucho tiempo, la disminución del pH, que ha sido causada por la producción de ácido orgánico, se ha considerado el efecto más importante de la fermentación de las LAB en la masa. Este descenso del pH influye en el comportamiento viscoelástico de la masa y es necesario para mantener la capacidad de manipulación y la

maquinabilidad en la producción industrial.

[0168] La relación entre ácido láctico y ácido acético es un factor importante que podría afectar al perfil del aroma y la estructura del producto final. El ácido acético es responsable de un gluten más corto y más duro, mientras que el ácido láctico puede explicar gradualmente una estructura de gluten más elástica.

[0169] Además, la actividad de las enzimas proteolíticas y amilolíticas presentes puede verse influida en mayor grado por el perfil de pH del período de fermentación de la acidificación biológica en contraste con la naturaleza más bien instantánea del régimen de acidificación química. La actividad óptima de estas enzimas, que desempeñan un papel importante en los cambios de los constituyentes de la masa, logra una actividad óptima a pH 4-5 para las enzimas proteolíticas y a pH 3,6-6,2 para las enzimas amilolíticas. Otras enzimas que podrían afectar a los componentes estructurales de la masa, cuya actividad depende del pH, incluyen las peroxidasas, las catalasas, las lipoxigenasas y las polifenoloxidasas.

[0170] Se informó de que ciertas bacterias del ácido láctico también pueden producir exopolisacáridos (EPS), que podrían tener un efecto positivo en el volumen y la vida útil del pan. Los EPS más frecuentes producidos durante la fermentación de la masa fermentada son: fructanos (levan, inulina) y glucanos (reuteran, dextrano, xantano). El EPS influye significativamente en la mejora de la textura de la masa. La producción de EPS en cantidades suficientes durante la fermentación de la masa crearía la posibilidad de reemplazar los hidrocoloides en el horneado. Se ha informado que los hidrocoloides mejoran la calidad del pan a través de la estabilización de la asociación agua-harina en la matriz de las masas.

[0171] Durante la fermentación de la masa, las LAB liberan también péptidos pequeños y aminoácidos libres importantes para el crecimiento microbiano y la acidificación de la masa. Además, los péptidos pequeños y los aminoácidos libres son importantes como precursores para el desarrollo del sabor de los productos horneados con levadura.

[0172] La LAB de la masa fermentada generalmente pertenece al género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* o *Weissella*.

[0173] La cinética de crecimiento de *Lactobacillus* spp. en M4 muestra un mayor crecimiento de bacterias que pertenecen a *Pediococcus* spp., especialmente *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* cuando MRS se suministra con M4 desechado de un cultivo DSM 29004 *Pediococcus pentosaceus* son grampositiva, facultativamente anaeróbicas, no móviles y no formadoras de esporas, miembros de las bacterias de ácido láctico de importancia industrial. Al igual que otras bacterias del ácido láctico, las *P. pentosaceus* son tolerantes al ácido, no pueden sintetizar porfirinas y poseen un metabolismo estrictamente fermentativo con ácido láctico como principal producto metabólico.

[0174] El ácido láctico se produce a partir de azúcares de hexosa a través de la vía de Embden-Meyerhof y a partir de pentosas por la vía de 6-fosfogluconato/fosfocetolasa. *P. pentosaceus* crecen entre pH 4,5 y 8,0, en NaCl al 9-10 %, hidrolizan la arginina y pueden utilizar maltosa.

[0175] Se ha informado de que cepas de *P. pentosaceus* contienen entre tres y cinco plásmidos residentes. Los rasgos ligados a los plásmidos incluyen la capacidad de fermentar la rafinosa, la melibiosa y la sacarosa, así como la producción de bacteriocinas como agentes antimicrobianos.

[0176] *P. pentosaceus* también tiene un efecto fungistático debido a la producción de ácido acético.

[0177] *P. pentosaceus* es una LAB homofermentativa y su fermentación produce una alta concentración de ácido láctico, en relación con el ácido acético, lo que da como resultado un sabor amargo suave y plano muy apreciado en la masa.

[0178] Hay dos tipos de compuestos aromáticos que se producen durante la fermentación de la masa. Los compuestos no volátiles incluyen ácidos orgánicos producidos por bacterias homo y heterofermentativas que acidifican, disminuyen el pH y producen aroma en la masa. Los compuestos volátiles están compuestos de alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y compuestos que contienen azufre producidos por acciones biológicas y bioquímicas durante la fermentación y aportan sabor.

[0179] En particular, *P. pentosaceus* produce diacetil y acetato de etilo que proporcionan un agradable sabor a mantequilla, lo que le da una particular suavidad a la masa.

BIBLIOGRAFÍA:

[0180]

Dutech C., Enjalbert J., Fournier E., Delmotte F., Barrès B., Carlier J., Tharreau D., Giraud T. (2007). *Challenges of microsatellite isolation in fungi*. Fungal Genet Biol. 44: 933-949.

- Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B. (1998). *The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 440: 325-331.
- 5 Karim A.S., Curran K.A., Alper H.S. (2013). *Characterization of plasmid burden and copy number in Saccharomyces cerevisiae for optimization of metabolic engineering applications*. FEMS Yeast Res. 13: 107-116.
- Légras J.L., Ruh O., Merdinoglu D., Karst F. (2005). *Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of Saccharomyces cerevisiae strains*. Int J Food Microbiol. 102: 73-83.
- 10 Légras J.L., Merdinoglu D., Cornuet J.M., Karst F. (2007). *Bread, beer and wine: Saccharomyces cerevisiae diversity reflects human history*. Mol Ecol. 16: 2091-2102.
- 15 Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Chinnici, F., Gardini, F., Tabanelli, G. (2014). *Effects of two different sourdoughs on the characteristics of Pandoro, a typical Italian sweet leavened baked good*. LWT - Food Science and Technology 59: 289-299
- Ralsler M., Kuhl H., Ralsler M., Werber M., Lehrach H., Breitenbach M., Timmermann B. (2012). *The Saccharomyces cerevisiae W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt*. Open Biol. 2:120093.
- 20 Richards K.D., Goddard M.R., Gardner R.C. (2009). *A database of microsatellite genotypes for Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek. 96: 355-359.
- Sturley S.L. & Young T. (1986). *Genetic Manipulation of Commercial Yeast Strains*. Biotechnol Genet Eng. 4: 1-38.
- 25 Thygesen J.B., Glerup H., Tarp B. (2012). *Saccharomyces boulardii fungemia caused by treatment with a probioticum*. BMJ Case Rep. 2012. pii: bcr0620114412.
- 30 Torriani S., Zapparoli G., Malacrinò P., Suzzi G., Dellaglio F. (2004). *Rapid identification and differentiation of Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus and their hybrids by multiplex PCR*. Lett Appl Microbiol. 38:239-244.
- Vaudano E. & Garcia-Moruno E. (2008). *Discrimination of Saccharomyces cerevisiae wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis*. Food Microbiol. 25: 56-64.
- 35 Vaughan-Martini A. & Martini A. (2011). Capítulo 61: *Saccharomyces Meyen ex Rees*!. In Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5ª ed.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, depositada con el número de acceso DSM 29004 ante la autoridad de depósito internacional Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

2. Cepa de levadura de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicha cepa permanece viable durante al menos 20 días a una temperatura comprendida entre 0 °C y +8 °C y por que dicha cepa muestra sucesivamente un vigor fermentativo y una actividad de crecimiento a una temperatura comprendida entre +12 °C y +38 °C, preferiblemente entre +25 °C y +28 °C.

3. Cepa de levadura de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dicha cepa permanece viable durante al menos 30 días a una temperatura comprendida entre 0 °C y +6 °C y por que dicha cepa muestra sucesivamente un vigor fermentativo y una actividad de crecimiento a una temperatura comprendida entre +12 °C y +38 °C, preferiblemente entre +25 °C y +28 °C.

4. Cepa de levadura de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** dicha cepa muestra un mayor vigor fermentativo en la fermentación de la masa, cuando se cultiva previamente en un medio de extracto de malta de cebada y de malta de trigo que cuando se cultiva en un medio a base de melaza a una temperatura comprendida entre +12 °C y +38 °C, preferiblemente entre +25 °C y +28 °C.

5. Cepa de levadura de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada por que** dicho medio de extracto de malta de cebada y de malta de trigo está en una concentración que varía de 0,1 g/l a 100 g/l preferiblemente comprendido entre 40 g/l y 80 g/l y dicho medio a base de melaza tiene una concentración de glucosa que varía de 0,1 g/l a 200 g/l, preferiblemente de 20 g/l a 100 g/l.

6. Masa sólida o fluida, que comprende al menos agua, harina y levadura de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Masa de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha levadura de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* está en forma de células vitales.

8. Masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en la que dicha levadura de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* está en una mezcla con otra levadura y/o microorganismos.

9. Masa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizada por que** cuando se envasa en un recipiente sellado a una temperatura comprendida entre 0 °C y +8 °C durante 20 días, o preferiblemente a una temperatura comprendida entre 0 °C y +6 °C durante 30 días, no presenta inflamaciones en el envase, desarrollo de olores o sabores anormales ni formación de líquido dentro del envase.

10. Uso de la cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la producción de masa sólida o fluida.

11. Procedimiento de preparación de masa refrigerada en forma sólida o fluida, preparada mezclando al menos agua, harina, levadura de la especie de *Saccharomyces cerevisiae*, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha masa se envasa en un recipiente.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha masa se envasa en un recipiente sellado que tiene una atmósfera interna modificada de 0 a 80 % de N₂ y de 0 a 60 % de CO₂, o en un recipiente sellado que tiene un envasado de atmósfera normal.

13. Procedimiento de preparación de un medio que tiene una concentración de nitrógeno alfa-amino superior a 300 mg/l, que comprende las etapas de:

- cultivo de la cepa de levadura de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un medio de extracto de malta de cebada y de malta de trigo durante al menos 36 horas;
- separación de la levadura del medio, preferiblemente por filtración o por centrifugación;
- obtención de un medio que tiene una concentración de nitrógeno alfa-amino superior a 300 mg/l.

FIGURA 1

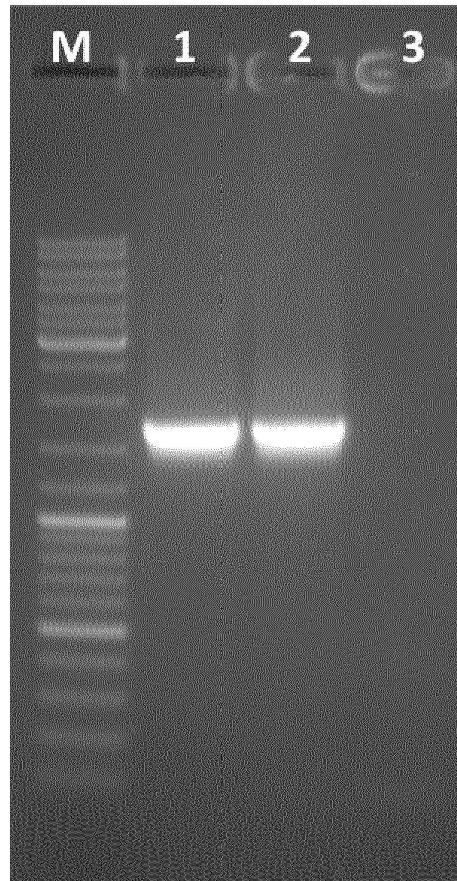


FIGURA 2a

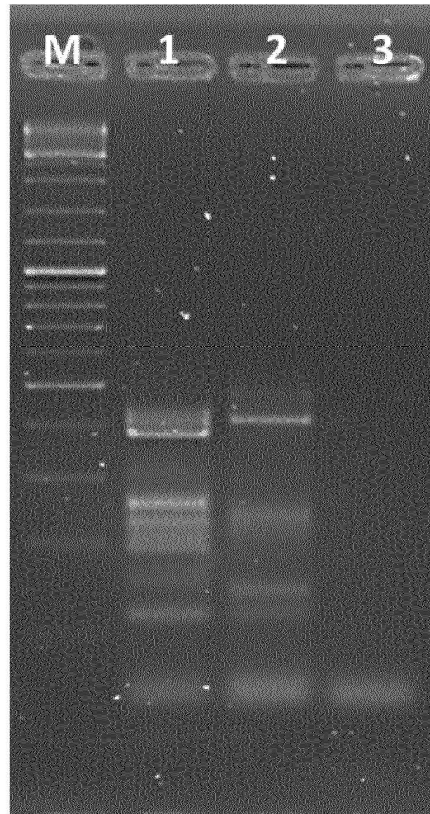


FIGURA 2b

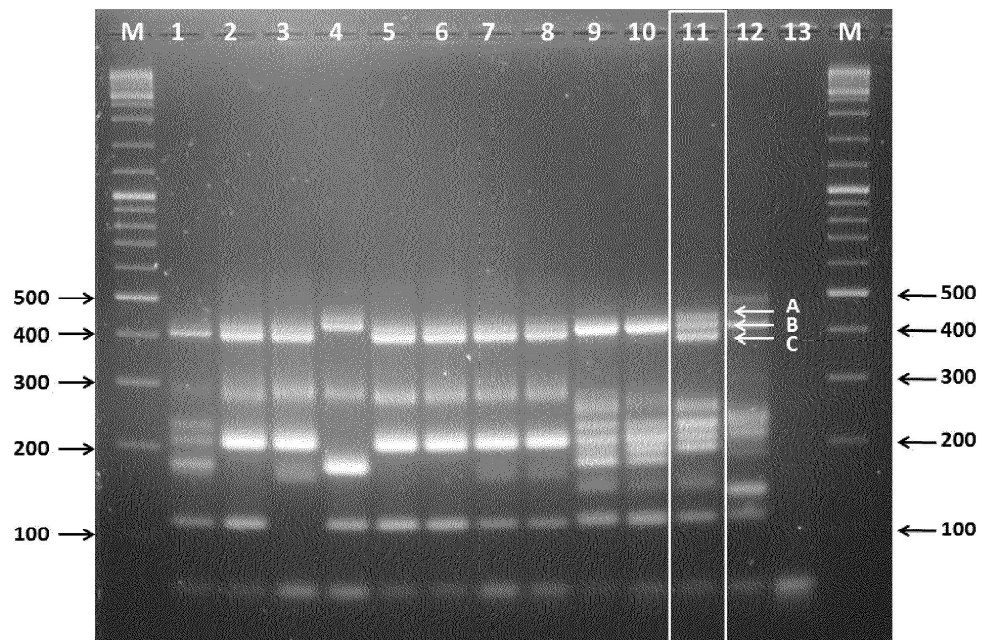


FIGURA 3

LOCUS	Longitud de fragmento (bp)*
YGL139W	124, 127
YFR028C	119,156
YGL014W	119, 156
YOL109W	262, 311
YML091C	179, 269
YLL049W	295
YBR240C	355
YDR160W	380, 406
YPL009C	432, 446
YOR267C	395, 422

FIGURA 4

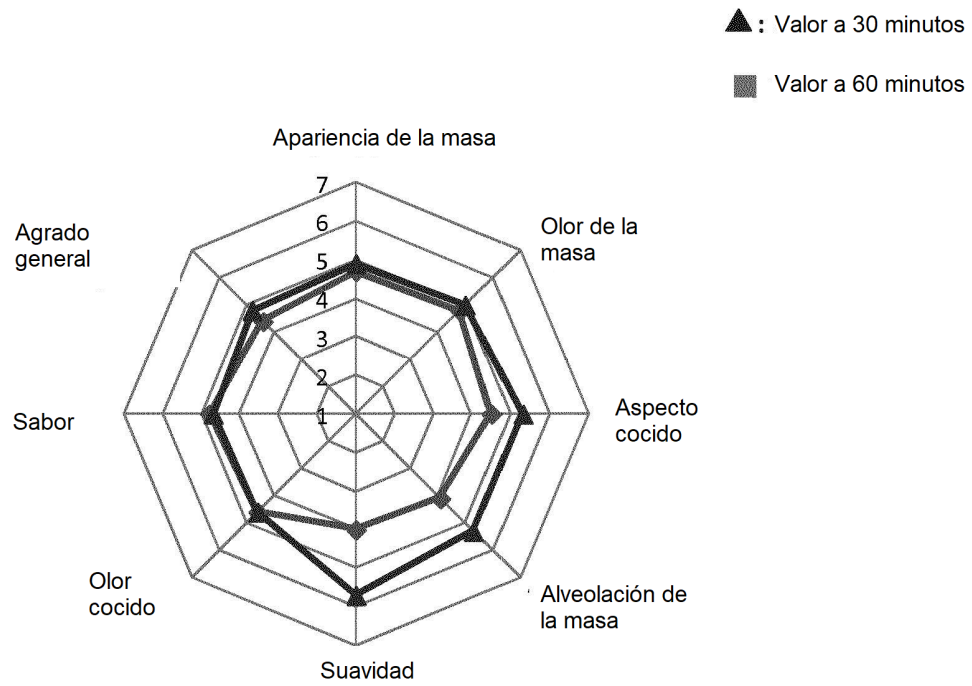


FIGURA 5

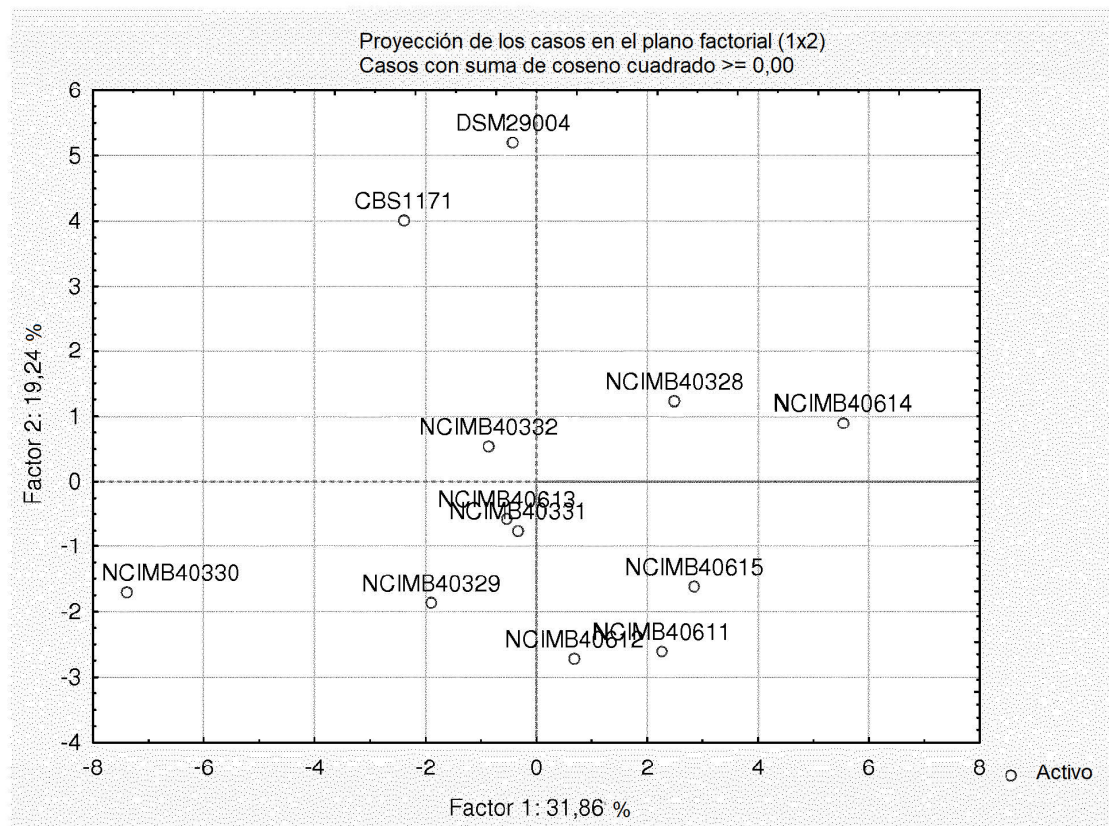


FIGURA 6

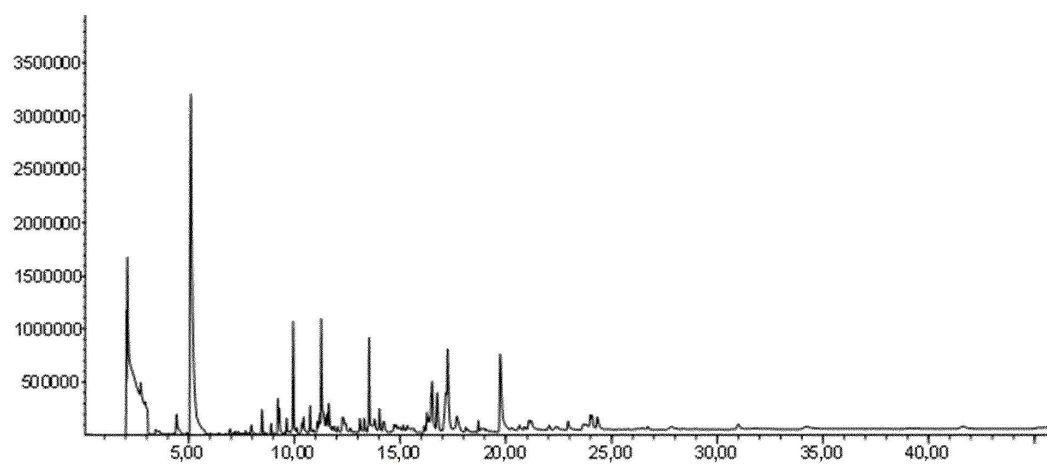


FIGURA 7a.

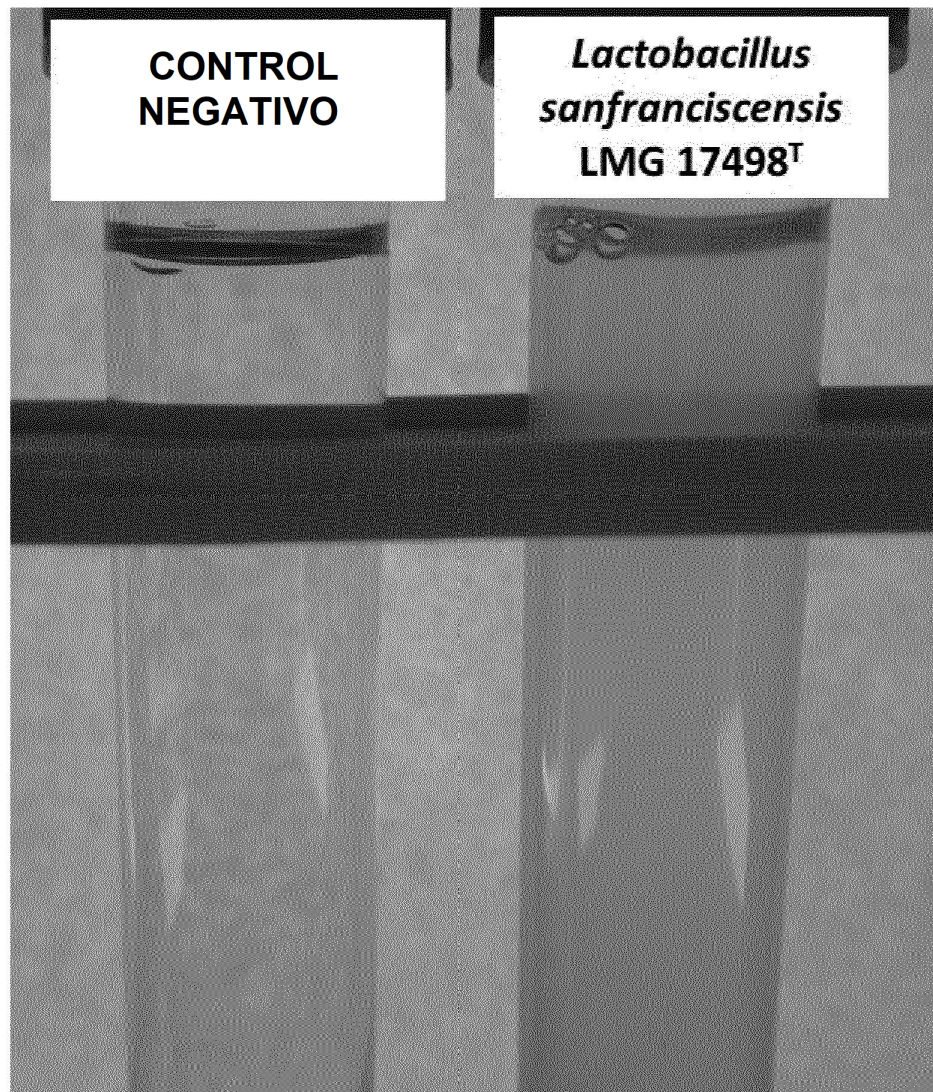


FIGURA 7b.

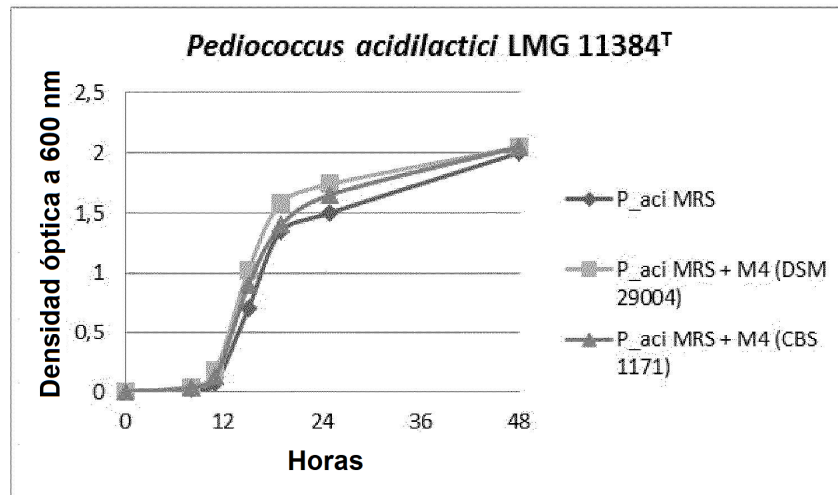


FIGURA 7c.

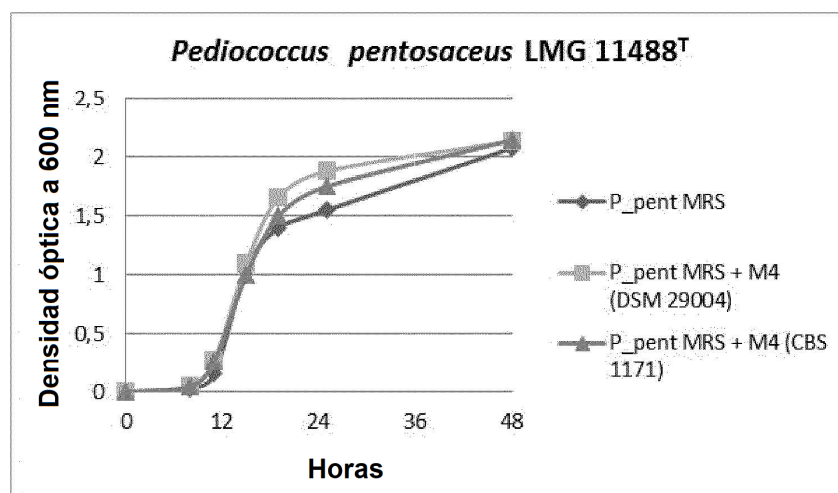


FIGURA 7d.

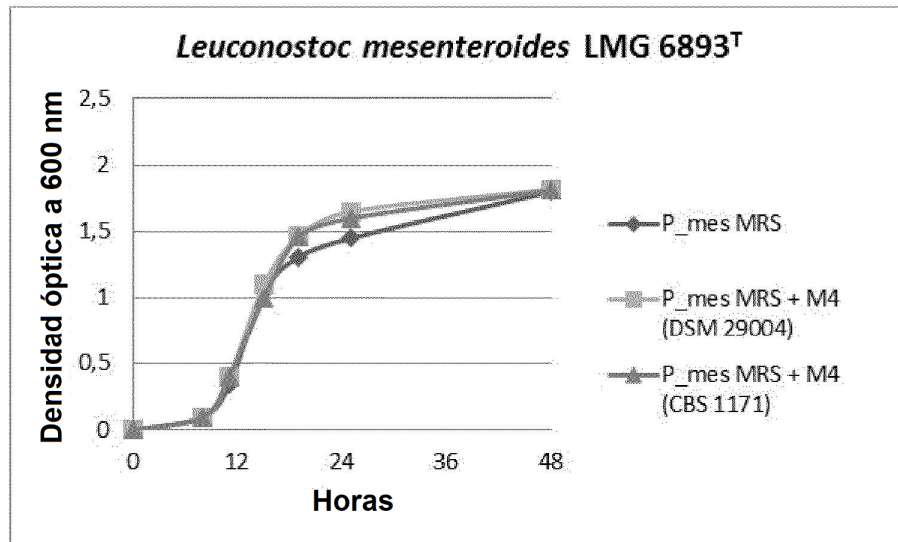


FIGURA 7e.

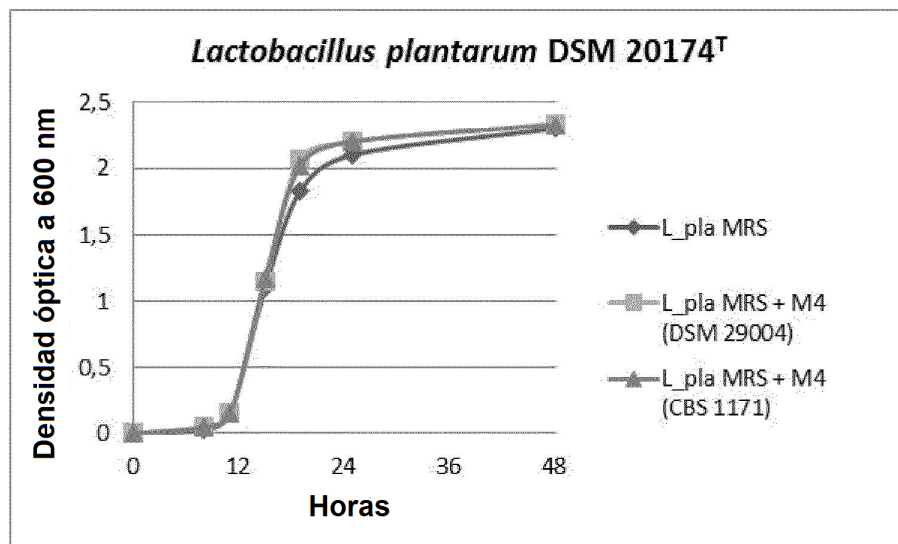


FIGURA 7f.

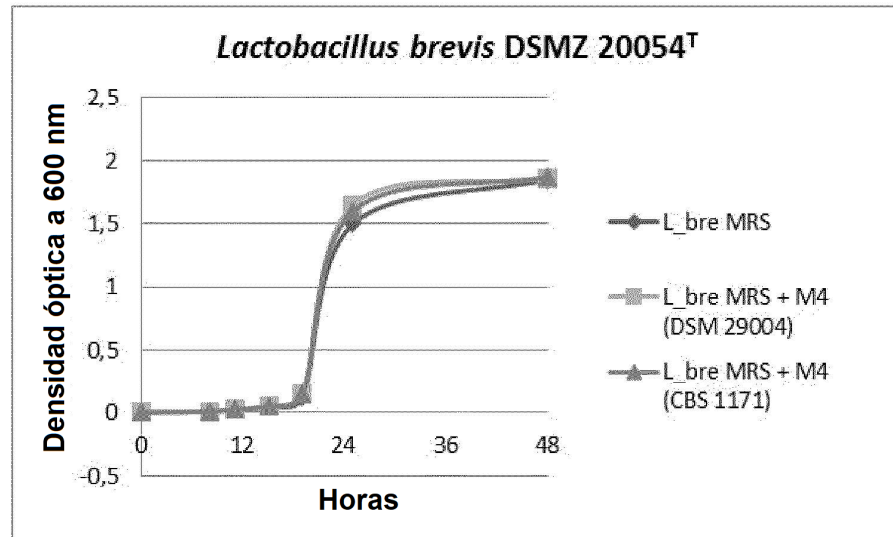


FIGURA 7g.

