

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

ES	(11) NUMERO	A1
	(21) 466.015	
	(22) FECHA DE PRESENTACION	
	23 DIC. 1977	

- 5 DIC. 1978

PATENTE DE INVENCION Concedido el Registro de acuerdo a los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
54172/1976	24 Diciembre 1976	Gran Bretaña

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12C11A21D	---

(64) TITULO DE LA INVENCION
"Procedimiento para la obtención de nuevas cepas de levaduras"

(71) SOLICITANTE (ES)
LESAFFRE ET CIE

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
41, rue Etienne Marcel, 75001 París, Francia

(72) INVENTOR (ES)
Philippe Clement y Annie Loiez née Hennette

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
M. Curell Suñol

PL-0705 77 B - LESAFFRE ET Cie
EX-FR-II

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

5. solicitada en España a favor de LESAFFRE ET CIE, de nacionalidad francesa, domiciliada en 41, rue Etienne Marcel, 75001 París, Francia, por "Procedimiento para la obtención de nuevas cepas de levaduras", con prioridad de la solicitud británica 54172/1976 de fecha 24 Diciembre 1976. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

10. La invención tiene por objeto un procedimiento completo y reproducible para la obtención de nuevas cepas de levaduras de panificación. - - - - -

Se conocen ya unas cepas rápidas adaptadas a la maltosa -es decir que permiten preparar levaduras que dan un desprendimiento de CO₂ importante en un tiempo dado en pastas constituidas por harina y agua- y que permanecen con

alto rendimiento en pastas poco azucaradas, es decir que no contienen más del 5% en peso de azúcar con respecto a la harina, o sea menos de 3,3% en peso con respecto a la pasta.-

- Se encuentra que estas cepas ven descender sus rendimientos de forma apreciable cuando el contenido de la pasta en azúcar aumenta y en particular cuando sobrepasa el 10% en peso con respecto a la harina. Ahora bien, dichas pastas representan una parte no negligible de la panificación en ciertos países. - - - - -
- 5.
10. Además, estas cepas, cuyo empleo se ha generalizado en la industria de levaduras desde hace aproximadamente 10 años, son rápidamente inhibidas desde que la pasta contiene concentraciones significativas de ácido acético, sórbico o propiónico o de sus sales. - - - - -
15. Ahora bien, las pastas ácidas que entran en la fabricación del pan de centeno, pan de levadura y otros, cuya acidez, que corresponde a un pH inferior a 4,7, es aportada por una mezcla de aproximadamente 10-50% en peso de ácido acético y de aproximadamente 50 a 90% en peso de ácido láctico y que están raramente azucaradas, representan también una parte no negligible de la panificación. - - - - -
- 20.

Finalmente, en todos los países, se adicionan a los productos de panificación destinados a tener una larga

- conservación o una conservación en condiciones difíciles, unos agentes inhibidores de mohos tales como los ácidos acético, sórbico, propiónico y sus sales, ello cualquiera que sea la dosis de azúcar contenida en la pasta; ahora bien,
5. se sabe que una levadura de panificación que resiste al ácido acético, es decir cuyo poder fermentativo no es inhibido de manera significativa en presencia de ácido acético no disociado, presenta en general la misma propiedad, es decir una mejor resistencia, frente a dosis inhibitoras de los ácidos propiónico o sórbico no disociados. - - - - -
- 10.

- Para evitar las insuficiencias de la técnica anterior en materia de cepas de levadura de panificación, la invención tiene por objeto proporcionar un procedimiento apropiado para permitir la obtención, de manera reproducible,
15. de nuevas cepas adaptadas a la maltosa, caracterizadas porque las levaduras tanto frescas como secas que permite obtener y de las que algunas por lo menos constituyen productos industriales nuevos, son: - - - - -

- o mejor adaptadas a la maltosa, - - - - -
20. - o bien de alto rendimiento en pastas azucaradas, es decir que contienen por lo menos 5% en peso de azúcar con respecto a la harina, - - - - -
- o bien de alto rendimiento en pastas ácidas, -

- o bien dotadas, preferentemente, de dos de las tres mencionadas propiedades y más preferentemente aún de las tres. - - - - -

Para ello, el técnico puede elegir entre: - - - -

5. - por una parte, una acción sobre los procedimientos de propagación de la levadura, es decir sobre sus procedimientos de cultivo y, - - - - -

- por otra parte, la obtención de nuevas cepas por mutación y/o hibridación. - - - - -

10. La modificación de los procedimientos de cultivo es onerosa y difícil de realizar y a menudo incrementa una propiedad más o menos en detrimento de otra. - - - - -

15. La búsqueda de nuevas cepas por hibridación y mutación presenta problemas complejos. La misma es altamente aleatoria si los objetivos y los fenómenos en juego no están bien controlados y si los planes de cruce o el proceso de mutación no están claramente definidos. La misma provoca de todas maneras la obligación de comprobar miles, incluso decenas de millares de colonias, lo que es imposible en un

20. plan práctico por medio de los tests de desprendimientos gaseosos en condiciones específicas (medio harina, azúcar o ácidos orgánicos), exigiendo dichos tests un cultivo en fermentador de algunos litros, como se ha descrito en el ejem-

plo 1 de la solicitud de patente francesa nº 75 20943, (que corresponde a la patente española 449.558 presentada el 8 julio 1976), la recogida de esta levadura y por lo menos 5 medidas de desprendimiento gaseoso según los ensayos del tipo A, del cual se hablará más adelante. El problema se complica debido a que los resultados obtenidos son difícilmente reproducibles; por ejemplo, una ligera modificación, difícilmente controlable de las condiciones del cultivo puede provocar importantes variaciones a nivel de los criterios medidos. - - - - -

5.

10.

Sin embargo, la búsqueda de nuevas cepas es teóricamente la mejor solución, tanto más cuanto que el empleo de condiciones de cultivo específicas no pueden más que mejorar, reforzar las propiedades naturales poseídas por los híbridos o mutantes obtenidos. - - - - -

15.

Las dos vías de búsqueda son de hecho complementarias y no concurrentes. - - - - -

El procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado porque por medio del primero y de por lo menos otro test de screening elegido de un conjunto de test de screening no recurriendo a ninguna medida de desprendimiento gaseoso, se seleccionan las cepas buscadas a partir de un conjunto de cepas diploides preparadas previamente o bien por hibridación, o bien por mutación de cepas existentes, estando los tests de dicho conjunto constituidos por:

20.

25.

5. - un primer test que consiste en medir el coeficiente de multiplicación medio de una cepa dada siguiendo la variación de la densidad óptica de un medio standard in-seminado por una suspensión de células obtenidas a partir de esta cepa, - - - - -

- un segundo test que consiste en medir de la misma manera el coeficiente de multiplicación medio de dicha cepa en presencia de un ácido inhibidor adicionado al medio standard, - - - - -

10. - un tercer test que consiste en medir la adaptación a la maltosa de dicha cepa en presencia de glucosa por determinación de la cantidad de maltosa subsistente en un medio standard después de que una cantidad conocida de glucosa adicionada a este medio haya sido completamente consumida, - - - - -

15. - un cuarto test que consiste en dosificar el contenido de invertasa de dicha cepa, definiéndose la unidad invertasa como la producción de un micromol de azúcares reductores en 5 minutos por mg de materias secas de levadura a 30°C y a pH 4,7, sin plasmólisis de la levadura, o bien un semi-micromol de sacarosa invertida, - - - - -

20. - un quinto test que consiste en medir el tiempo de latencia de dicha cepa, es decir el retardo del inicio de la multiplicación, siguiendo la variación de la densidad

Óptica de la suspensión de levadura utilizada en el primer test después de haber conferido a esta suspensión una concentración de azúcar de por lo menos 20%. - - - - -

5. En el mencionado procedimiento, para el primer test, se puede realizar un precultivo de 48 horas a 30°C en un tubo de ensayo que contiene 10 ml de un medio que tiene la composición siguiente: - - - - -

- extracto de levadura .. 1%
- peptona 2%
- 10. - sacarosa 2%

designado en la continuación del texto por la denominación "medio YEP". - - - - -

El precultivo puede realizarse también en otros medios. - - - - -

15. Una cantidad conocida de este precultivo sirve a continuación para inseminar un matraz óptico que contiene 30 ml de un medio idéntico o equivalente al medio YEP. La curva de crecimiento de la levadura se establece entonces por medición de la densidad óptica cada hora a 600 mμ. - -

20. A partir de esta curva, se puede calcular el coeficiente de multiplicación medio μ dado por: - - - - -

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

donde x representa la población celular en el tiempo t. - -

Este primer test tiene un doble interés en el sentido de que puede servir de testigo para los otros tests y que permite eliminar todas las cepas diploides que no tienen un coeficiente de multiplicación suficiente, es decir susceptibles de dar un rendimiento insuficiente o de tener unos desprendimientos gaseosos muy pequeños, como por ejemplo las cepas demasiado penalizadas cuando tiene lugar un tratamiento de mutación. - - - - -

10. Siempre en el mencionado procedimiento, para el segundo test, el ácido inhibidor adicionado al medio de cultivo consiste en una mezcla de ácido acético y de ácido láctico en cantidad y en proporciones tales que inhibe a un porcentaje comprendido entre 50% y 90% el crecimiento de una cepa testigo que presenta sobre pasta que contiene ácidos orgánicos inhibidores y/o sobre pasta azucarada una disminución importante de su poder de desprendimiento de CO₂.

20. Se ha hallado, en efecto, que existía una probabilidad no negligible para que las cepas que, en un medio que contiene una cantidad de ácido acético apropiada para inhibir en una gran proporción el crecimiento de los híbridos conocidos de levaduras rápidas adaptadas a la maltosa, presenten un crecimiento mejor que estos híbridos, - - - - -

- o sean la sede de una inhibición menor en fer-

mentación sobre pastas ácidas (más de 50% de probabilidades), - - - - -

- 5. - o bien de mayor rendimiento y, a menudo, incluso netamente de más rendimiento en pastas azucaradas que dichos híbridos rápidos, adaptados a la maltosa. - - - - -

- 10. Siempre en el mencionado procedimiento y para el tercer test, la cepa de levadura es puesta en presencia de una solución azucarada que contiene una cantidad conocida de glucosa y de maltosa. La cantidad de glucosa se elige de forma tal que sea completamente consumida al final del ensayo que dura en general 1 hora. Al final del ensayo, la reacción es parada por centrifugación en frío y se dosifica el azúcar restante en el sobrenadante. De ello se deduce el porcentaje de maltosa consumida por la levadura. Se ha hallado que el porcentaje de maltosa consumida traduce generalmente bien la adaptación más o menos buena de la cepa ensayada a la fermentación de la maltosa y también la rapidez de la cepa. - - - - -
- 15.

- 20. Una variante consiste en seguir, en función del tiempo, la desaparición de la glucosa y de la maltosa adicionadas juntas. Se sigue la desaparición de los azúcares totales por dosificación con la antrona y la de la glucosa por dosificación enzimática específica, determinándose la cantidad de maltosa por diferencia. - - - - -

Se ha constatado que las cepas no adaptadas a la maltosa no hacen fermentar, en este ensayo, la maltosa mientras queda glucosa; por el contrario, las cepas adaptadas a la maltosa hacen fermentar más o menos rápidamente la maltosa incluso cuando hay aún glucosa. - - - - -

5.

El mencionado ensayo se realiza partiendo de una cantidad conocida de materia seca obtenida a partir de la cepa de levadura ensayada. Esta cantidad conocida de materia seca de levadura puede, por ejemplo, obtenerse por filtración de la levadura presente en el matraz óptico al final del primer test, o por filtración de una cantidad de levadura obtenida en el marco de un cultivo agitado similar y por determinación de las materias secas de esta torta, materias secas que son en general del orden del 20%. - - - -

10.

15.

La adaptación a la maltosa puede ser también apreciada de una manera semicuantitativa recubriendo unas colonias de las cepas ensayadas separadas regularmente sobre una placa de Petri con un papel de filtro impregnado con una solución de maltosa, por ejemplo 0,1 molar, y con un colorante indicador de acidez tipo Bromo-Cresol Púrpura y vigilando el viraje colorimétrico al cabo de un tiempo dado. Este test aproximado es una primera aproximación posible, esencialmente, después de la mutación. De cualquier manera, el método descrito anteriormente debe ser siempre empleado para afinar esta primera selección eventual. - - - - -

20.

25.

- Siempre en el mencionado procedimiento, se indica, con respecto al cuarto test, que la unidad invertasa puede ser dosificada por ejemplo de la manera siguiente. Se parte de una cantidad conocida de materias secas de levadura del orden de 0,1 a 0,4 mg que pueden obtenerse por filtración de la levadura presente en el matraz óptico al final del primer test. Esta cantidad de materias secas de levadura es puesta en presencia de sacarosa con concentración final 0,1 molar en un tubo de ensayo en medio tamponado, tampón ceta-
to a pH 4,7, colocado en baño maría a 30°C. Al cabo de 5 minutos, la reacción de inversión de la sacarosa es bloqueada por adición del reactivo al dinitrosalicilato de sodio que sirve para dosificar los azúcares reductores formados por reacción colorimétrica. - - - - -
- 5.
- 10.
15. La mayor o menor riqueza en invertasa puede ser también apreciada de una manera semicuantitativa sobre colonias de las cepas ensayadas sobre placa de Petri, recubriendo la placa con un papel filtro impregnado de sacarosa y unos reactivos necesarios para la dosificación enzimática de la glucosa formada por reacción colorimétrica (O-dianisidina por ejemplo). Este test es una primera aproximación posible, esencialmente después de mutación. Puede, en algunos casos, permitir una primera selección muy basta. De todas maneras, el método simple y práctico descrito anteriormente debe siempre ser empleado para afinar esta primera selección. - - - - -
- 20.
- 25.

Se ha hallado que existe una gran probabilidad de que todas las cepas de levadura que tengan menos de 35 unidades invertasa, preferentemente menos de 30 unidades y, más preferentemente aún, menos de 20 unidades invertasa, sean de alto rendimiento en pastas azucaradas, sobre todo si han dado buenos resultados en el primer test y en el tercer test. - - - - -

5.

A título indicativo, se recuerda que los híbridos de levadura rápida adaptados a la maltosa, empleados hasta el presente en la industria de levaduras, tienen un contenido en invertasa que es siempre superior a 40. - - - - -

10.

Siempre en el citado procedimiento, se señala, con respecto al quinto test, que cuanto más corto es el tiempo de latencia, más probabilidades tiene la cepa ensayada de ser osmotolerante, es decir de alto rendimiento en pastas azucaradas. - - - - -

15.

En conclusión, se ha subrayado que la utilización conjugada del primer y tercer tests pueden o bien permitir seleccionar unas cepas aún más rápidas y mejor adaptadas a la maltosa que las que se utilizan actualmente, o bien permitir seleccionar, cuando son acoplados a los otros tests descritos, unas cepas adaptadas a la maltosa y de más rendimiento en pastas azucaradas o, preferentemente, en pastas ácidas. - - - - -

20.

Así, se ha hallado que una selección realizada utilizando de forma conjugada el primer test de screening (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presenta un coeficiente de multiplicación equivalente al de las mejores cepas de levadura de panadería del comercio),

- 5. el tercer test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presenta una adaptación a la maltosa que corresponde a una cantidad de maltosa consumida igual a por lo menos 50% de la maltosa consumida en el modo operatorio
- 10. considerado por las mejores cepas de levadura de comercio adaptadas a la maltosa) y el cuarto test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presenta un contenido en invertasa inferior a 35 unidades, preferentemente inferior a 30 unidades, y más preferentemente aún inferior a 20 unidades) conduce a unas cepas mejor adaptadas a la maltosa o/y de más rendimiento en pastas azucaradas. - - -
- 15.

Todas las cepas así seleccionadas tienen características nuevas con respecto a todas las cepas previamente conocidas. - - - - -

- 20. Se ha hallado también que una selección realizada utilizando de forma conjugada el primer test de screening (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presenta un coeficiente de multiplicación equivalente al de las mejores cepas de panadería del comercio), el tercer
- 25. test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presenta una adaptación a la maltosa que corresponde a

una cantidad de maltosa consumida igual a por lo menos 50% de la maltosa consumida por las mejores cepas adaptadas a la maltosa) y el segundo test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presenta una inhibición menor del cultivo en presencia del ácido acético adicionado al medio standard) conduce a unas cepas mejor adaptadas a la maltosa o/y de mayor rendimiento en pastas ácidas y a menudo igualmente de mayor rendimiento también en pastas azucaradas. - - - - -

10. Todas las cepas así seleccionadas tienen características nuevas con respecto a todas las cepas previamente conocidas. - - - - -

Una selección realizada por medio de una combinación de los cuatro primeros tests descritos anteriormente conduce a unas cepas que tienen por lo menos dos y muy a menudo tres de las propiedades siguientes: - - - - -

- adaptación mejorada a la maltosa, - - - - -
- mejores rendimientos en pastas azucaradas que tienen de 1 a 20% de azúcar, - - - - -
- 20. - mejores rendimientos en pastas que contienen ácido acético no disociado. - - - - -

Todas las cepas así seleccionadas tienen características nuevas con respecto a todas las cepas previamente

conocidas. - - - - -

- El quinto test (siendo el criterio de selección considerado la búsqueda de un tiempo de latencia lo más corto posible cuando se ha adicionado a medio standard del primer test una cantidad correspondiente a una concentración en sacarosa en el medio de 30%) puede servir para confirmar la significación de los resultados del cuarto test (bajo contenido en invertasa). Puede también servir, asociado con el primer test, y preferentemente también con el cuarto test (siendo el criterio de selección considerado un contenido en invertasa inferior a 20 unidades) para la búsqueda de cepas particularmente de alto rendimiento en pastas con 10-25% de sacarosa. - - - - -
- 5.
 - 10.

- Siendo así y siempre en el mencionado procedimiento, la hibridación de acuerdo con la invención consiste esencialmente en cruces sistemáticos de haploides salidos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* rápidas adaptadas a la maltosa y de haploides salidos de cepas muy lentas, no adaptadas a la maltosa, pero bien adaptadas a las pastas azucaradas y a veces también a las pastas ácidas, que pertenecen al género *Saccharomyces*, y particularmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. - - - - -
- 15.
 - 20.

- Como se ha indicado más arriba, estas cepas de levaduras de panadería *Saccharomyces cerevisiae* rápidas, adaptadas a la maltosa, son bien conocidas y son generalmente
- 25.

las que sirven actualmente para la fabricación de las levaduras frescas comercializadas en el mundo. Dichas cepas son por ejemplo descritas en las patentes británicas 868 621 (cepa ATCC 13 601), 868.633 (cepa ATCC 13 602), 989.247 (cepas CBS Ng 740 y Ng 1777), etc. Esta lista de patentes y de cepas presentadas en los centros de colección como la ATCC (American Type Culture Collection), la CBS (Centraalbureau voor Schimmel Cultures de Baarn) o la NCYC (National Collection of Yeast Cultures) no es limitativa, ni completa. - - - - -

5. 10.

Unas cepas lentas de la industria de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, otras cepas de *Saccharomyces* con carácter osmófilo, como por ejemplo unas cepas de *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii* están disponibles en los principales centros de colección como la ATCC, la CBS o la NCYC. - - - - -

15.

Se ha hallado que ciertas cepas lentas de la industria de levaduras, antiguamente utilizadas en Europa, y ciertas cepas de destilería, como por ejemplo el aislado que está depositado en la NCYC bajo el nº R 30 y que se describe en la patente francesa nº 75 20943, eran unos materiales extremadamente interesantes para este trabajo de cruce. - -

20.

La reproducción por esporas de las cepas de partida, la obtención de los haploides y la conjugación de estos haploides se efectúan según las técnicas descritas en el ca

25.

5. título 7 "Sporulation and Hybridization of Yeasts" escrito por R.R. FOWELL del libro "The Yeasts", volumen 1, editado por Anthony H. ROSE y J.S. HARRISON, 1969, Academic Press, London and New York. La técnica de hibridación considerada entre haploides de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la técnica del mass-mating. La micromanipulación puede ser el método a preferir para cruces donde intervienen haploides de otros *Saccharomyces* distintos del *Saccharomyces cerevisiae*.

10. Se obtienen así unas cepas que responden a los criterios considerados en los primer y tercer tests así como a los criterios considerados en uno o varios de los otros tres tests. - - - - -

15. Se ha verificado que la gran mayoría de las lavaduras obtenidas a partir de las cepas seleccionadas con la ayuda del conjunto de tests del procedimiento de acuerdo con la invención tenían en los diferentes estados de cultivo sucesivos, a saber en los estados de cultivo 3 litros, después de cultivo en fermentador piloto, las propiedades fermentativas enunciadas, siendo estas propiedades medidas con la ayuda de los test A (realizados con la ayuda del fermentómetro de BURROWS y HARRISON) y de los tests B (realizados con la ayuda del zimotaquígrafo CHOPIN) que se describen más adelante. - - - - -

25. Siempre en el mencionado procedimiento, la mutación de acuerdo con la invención y que constituye una vía

totalmente nueva para la obtención de cepas industriales de levaduras de panificación, vía que ha sido posible abordar gracias al conjunto de tests del mismo procedimiento, consiste esencialmente en una mutagénesis efectuada sobre haploide o sobre diploide y que utiliza unos agentes mutágenos tales como el etilmetano sulfonato y la N-metil,N-nitro, N-nitrosoguanidina o NTG, pudiendo los haploides obtenidos al final del tratamiento mutágeno ser entonces utilizados como material de cruce en los trabajos de hibridación. - -

10. Preferentemente, se recurre a una mutagénesis a la NTG provocando un porcentaje de supervivencia comprendido entre 2% y 80%. - - - - -

15. Los porcentajes de supervivencia elegidos deben ser más elevados cuando se trabaja sobre haploides que cuando se trabaja sobre diploides de tal manera que estos haploides conservan su actitud para conjugarse. Los porcentajes de supervivencia elegidos generalmente para el trabajo sobre haploides han sido comprendidos entre 40% y 80%. - -

20. Se ha hallado que los mutantes diploides interesantes obtenidos por mutagénesis a la NTG permanecían casi siempre estables. - - - - -

Se ha hallado también que era posible obtener unos mutantes interesantes, a saber: - - - - -

5. - unos mutantes haploides o diploides adaptados a la maltosa utilizando como materiales de partida unas cepas diploides lentas con alto rendimiento en pastas azucaradas o, preferentemente, también de alto rendimiento en pastas ácidas, o unos haploides obtenidos a partir de estas cepas,

10. - unos mutantes haploides o diploides que tienen un contenido en invertasa disminuido, una resistencia mejorada a la acidez acética y/o un tiempo de latencia bajo utilizando como materiales de partida unas cepas diploides rápidas adaptadas a la maltosa o unos haploides obtenidos a partir de estas cepas. - - - - -

15. Siendo así, las nuevas cepas rápidas y adaptadas a la maltosa, obtenidas por realización del procedimiento de acuerdo con la invención, pueden estar caracterizadas porque permiten la preparación de levaduras tanto frescas como secas, caracterizadas a su vez por el desprendimiento gaseoso que dan en el marco de un cierto número de tests designados por las referencias A (A₁, A'₁, A₂, A'₂, A₃, A'₃, A₄, A'₄, A₅, A'₅) realizados con la ayuda del fermentómetro de BURROWS y HARRISON y por las referencias B (B₁, B'₁ y B'₃) realizados con la ayuda del zimotaquígrafo CHOPIN y que serán definidos a continuación. - - - - -

20.

- Test A₁ (levaduras comprimidas frescas)

- A 20 g de harina incubada a 30°C, se adiciona

- un peso de levadura comprimida que corresponde a 160 mg de materias secas, siendo esta levadura diluida en 15 ml de agua que contienen 27 g de NaCl por litro y 4 g de SO_4 $(\text{NH}_4)_2$ por litro; se malaxa con la ayuda de una espátula durante 40 segundos, de manera que se obtenga una pasta que se coloca al baño maría regulado a 30°C; trece minutos después del principio del malaxado, el recipiente que contiene la pasta es cerrado herméticamente; la cantidad total de gas producido es medida después de 60 y después de 120 minutos; esta cantidad está expresada en ml a 30°C y bajo 760 mm de Hg. - - - - -
- 5.
- 10.

- Test A'₁ (levaduras secas)

- Idéntico al ensayo A₁, pero, previamente al malaxado, se rehidrata la levadura seca en agua destilada, a 38°C; se utiliza a este efecto 40% del volumen de agua de hidratación utilizado; el complemento de agua adicionado con 405 mg de NaCl, es adicionado al final de los 15 minutos de rehidratación. - - - - -
- 15.

- Test A₂ (levaduras comprimidas frescas)

- Ensayo idéntico al ensayo A₁, pero se adicionan a la harina 100 mg de sacarosa; la cantidad total de gas producido es medida después de 60 minutos. - - - - -
- 20.

- Test A'₂ (levaduras secas)

- Ensayo idéntico al ensayo A'₁, pero se adicionan

a la harina 100 mg de sacarosa; la cantidad total de gas producido es medida después de 60 minutos. - - - - -

- Test A₃ (levaduras comprimidas frescas)

5. - Ensayo idéntico al ensayo A₁, pero se adicionan a la harina 2 g de sacarosa; la cantidad total de gas producida es medida después de 60 minutos. - - - - -

- Test A'₃ (levaduras secas)

10. - Ensayo idéntico al ensayo A'₁, pero se adicionan a la harina 2 g de sacarosa; la cantidad total de gas producido es medida después de 60 minutos. - - - - -

- Test A₄ (levaduras comprimidas frescas)

- Ensayo idéntico al ensayo A₁, pero se adicionan a la harina 5,5 g de sacarosa; la cantidad total de gas producido es medida después de 60 minutos. - - - - -

15. - Test A'₄ (levaduras secas)

- Ensayo idéntico al ensayo A'₁, pero se adicionan a la harina 5,5 g de sacarosa; la cantidad total de gas producido es medida después de 60 minutos. - - - - -

- Test A₅ y A'₅

20. - Ensayos idénticos respectivamente a los ensayos

5. A₁ y A'₁, con la diferencia de que se adiciona a la suspensión de levadura, justo antes de la adición de ésta a la harina, una cantidad de 0,15 ml de una mezcla constituida por 15 g de ácido acético y 80 g de ácido láctico, substituyendo estos 0,15 ml a 0,15 ml de agua de dilución. - - - - -

- Test B₁ (levaduras comprimidas frescas y levaduras secas instantáneas que no tienen necesidad de una rehidratación previa)

10. - A 250 g de harina, se adiciona un peso de levadura comprimida o de levadura seca instantánea que corresponde a 1,6 g de materias secas de levadura, y 150 ml de agua salada (50 g de sal/1,5 l de agua); se amasa 6 minutos; la temperatura de la pasta debe ser de 27°C al final del amasado; se coloca la pasta en el aparato y 6 minutos, exactamente medidos, después del final del amasado, se pone a presión la cámara a temperatura constante de 27°C; se mide el desprendimiento total registrado sobre gráfico, en ml, después de 1 hora y 3 horas. - - - - -

- Test B'₁ (levaduras secas que deben ser rehidratadas)

20. - Ensayo idéntico al ensayo B₁, pero previamente al amasado la levadura seca es rehidratada en agua destilada a 38°C (50 ml) durante 15 minutos; el complemento de agua y de sal se adiciona al final de los 15 minutos de rehidratación. - - - - -

- Test B'3 -

5. - Ensayo idéntico al ensayo B'1, con la diferencia de que se adicionan a la suspensión de levadura obtenida después de dilución de la levadura fresca o después de rehidratación de la levadura seca, justo antes del amasado, una cantidad de 2 ml de una mezcla constituida por 15 g de ácido acético y 80 g de ácido láctico, substituyendo estos 2 ml a 2 ml de agua de dilución. - - - - -

10. Las nuevas cepas obtenidas pueden por tanto estar, caracterizadas por las levaduras comerciales que permiten producir y que serán definidas a continuación. - - - - -

1. Cepas que dan levaduras frescas de alto rendimiento en pastas azucaradas y caracterizadas por el hecho de que dan lugar a: - - - - -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 112 y, preferentemente, a 115 ml de CO₂ en el test A₁ en 2 horas, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 1,500 ml de CO₂ en el test B₁ en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 135 ml de CO₂ en el test A₁ y a 1.700 ml de CO₂ en el test B₁, - - - - -

20.

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 53, preferentemente a 55 ml de CO₂ en 1 hora en el test A₂ y, más preferentemente aún, igual o superior a 60 ml en es-

te test en 1 hora, - - - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 50 ml de CO₂ en 1 hora en el test A₃ y, preferentemente, igual o superior a 55 ml en el test A₃ en 1 hora, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 25 ml de CO₂ en el test A₄ y, preferentemente, igual o superior a 30 ml de CO₂ en el test A₄ en 1 hora y, más preferentemente aún, igual o superior a 35 ml de CO₂, - - - - -

10. siendo las levaduras que alcanzan los valores preferentes para dos de los mencionados tests particularmente preferidas. - - - - -

2. Cepas que dan levaduras secas de alto rendimiento en pastas azucaradas y caracterizadas porque dan lugar a: - - - - -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 98, preferentemente 100 ml de CO₂ en el test A'₁ en 2 horas, superior o igual a 1.350 ml de CO₂ en el test B₁ en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 115 ml de CO₂ en el test A'₁ y a 1.500 ml de CO₂ en el test B₁ en 3 horas, - -

20. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 46, preferentemente a 48 ml de CO₂ en el test A'₂ en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 52 ml en el test A'₂, - - - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 44 ml de CO₂ en el test A'₃ y, preferentemente, igual o superior a 47 ml de CO₂ en el test A'₃, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 21 ml de CO₂ en el test A'₄ y, preferentemente, igual o superior a 26 ml de CO₂. - - - - -

3. Cepas que dan levaduras frescas de alto rendimiento en pastas ácidas y caracterizadas porque dan lugar a:

10. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 115 ml de CO₂ en el test A₁ en 2 horas e igual o superior a 1.500 ml de CO₂ en el test B₁ en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 135 ml de CO₂ en el test A₁ y a 1.700 ml de CO₂ en el test B₁, - - - - -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 40 ml de CO₂ en el test A₅ en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 45 ml de CO₂ en este test A₅ en 1 hora, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 900 ml de CO₂ en el test B'₃ en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 1.000 ml de CO₂ en este test B'₃ en 3 horas. - - - - -

20. 4. Cepas que dan unas levaduras secas de alto rendimiento en pastas ácidas y caracterizadas porque dan lugar a: - - - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a

100 ml de CO₂ en el test A'₁ en 2 horas, superior a 1.350 ml de CO₂ en el test B₁ en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 115 ml de CO₂ en el test A'₁ y a 1.500 ml de el test B₁ en 3 horas, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso superior o igual a 32 ml de CO₂ en el test A'₅ en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 38 ml de CO₂ en el test A'₅; un desprendimiento gaseoso igual o superior a 750 ml de CO₂ en el test B'₃ en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 820 ml de CO₂ en el test B'₃. - - - - -
- 10.

5. Cepas que dan unas levaduras frescas, por una parte, y unas levaduras secas, por otra parte, de alto rendimiento en pastas azucaradas y en pastas ácidas y caracterizadas porque: - - - - -

15. - las primeras dan lugar simultáneamente a los desprendimientos presentados por las mencionadas levaduras frescas de alto rendimiento en pastas azucaradas y por las mencionadas levaduras frescas de alto rendimiento en pastas ácidas y, - - - - -

20. - las segundas dan lugar simultáneamente a los desprendimientos presentados por las mencionadas levaduras secas de alto rendimiento en pastas azucaradas y por las mencionadas levaduras secas de alto rendimiento en pastas ácidas. - - - - -

En lo que precede, se designa en general por levaduras frescas las que tienen un contenido en materias secas de aproximadamente 28 a 35% y por levaduras secas las que tienen un contenido en materia seca superior al 92%. - - -

5. El contenido en nitrógeno de estas levaduras ha sido generalmente elegido en el interior de las horquillas siguientes: - - - - -

- de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5 para las levaduras comprimidas frescas, - - - - -

10. - de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 8,2 para las levaduras secas. - - - - -

Una vez que se dispone de la cepa buscada, se puede preparar la levadura comprimida fresca correspondiente al contenido en materias secas próximo a 28 a 35% recurriendo a un esquema de propagación clásico, apropiado para proporcionar unas levaduras secas estables en conservación y estables al secado. Estas levaduras pueden, a continuación, ser secadas a aproximadamente 92% de materias secas o más con la ayuda de un procedimiento de secado particularmente cuidadoso. - - - - -

20. Preferentemente, se conducirá el cultivo de la levadura de manera que se obtenga una levadura fresca con 28-35% de materias secas que tengan las características si-

siguientes: - - - - -

- cantidad de grumos inferior a 5% y, preferentemente, inferior a 1%, - - - - -
- 5. - descenso crioscópico del agua externa de la levadura inferior a 0,5°C, y, preferentemente, inferior a 0,3°C. Se señala que, para medir el descenso crioscópico del agua externa de una levadura prensada con 30-35% de materias secas, se realiza una crema con 100 g de la levadura prensada
- 10. y 30 g de agua perfectamente desmineralizada, se centrifuga esta crema y se mide el descenso crioscópico del sobrenadante obtenido, por ejemplo con la ayuda de un crioscopio de tipo BECKMAN (PROLABO nº 0329 600). El descenso del punto de congelación medido es proporcional a la cantidad de moléculas-gramo de sustancias disueltas en el agua externa.
- 15. - - - - -

20. Si se desean obtener unas levaduras muy rápidas, se elegirán unos contenidos en nitrógeno bastante elevados 8-8,5% de nitrógeno sobre materias secas, incluso un poco más. Si se desea obtener unas levaduras que tengan unas características más particulares, por ejemplo la estabilidad al secado, se busca sobre todo respetar las características siguientes: - - - - -

- 5. - contenido en proteínas correspondiente al óptimo de la cepa cultivada teniendo en cuenta las características deseadas; este contenido varía según las cepas y las características deseadas para la levadura pero, para las cepas relativamente rápidas, es del orden de 7,5%-8% de nitrógeno sobre materias secas e incluso menos; pudiendo definirse el óptimo del contenido en nitrógeno para la estabilidad al secado como el valor por encima del cual cualquier aumento de este contenido no da más que una ligera ganancia de actividad, pero, después de secado, una pérdida suplementaria de actividad igual o superior a esta ganancia. Este óptimo depende mucho de la cepa, de las condiciones de cultivo, del test de referencia (con azúcar, sin azúcar). No puede ser determinado más que experimentalmente caso por caso. Es evidente para el técnico que todos los valores de nitrógeno sobre materias secas dados a continuación no son más que indicativos: - - - - -
- 10.
- 15.
- 20.

$$- \frac{\text{trealosa}}{\text{materias secas}} > 12\% ;$$

$$- 2,3 < \frac{N}{P_{20_5}} < 3,8.$$

Preferentemente, se cuidará particularmente de aportar al medio de cultivo los factores de crecimiento de

los que cada cepa tenga necesidad: biotina, vitaminas del grupo B, etc. - - - - -

5. A la levadura destinada al secado, se adiciona preferentemente una fina emulsión constituida por un emulsionante apropiado, como por ejemplo los ésteres de sorbitol, los ésteres de poliglicerol a razón de 1,5 a 2% de materias secas de levadura y eventualmente de un agente espesante. - - - - -

10. La levadura destinada al secado, con 30-35% de materias secas, es extruida a través de una reja de anchura de malla 0,5 a 3 mm y, preferentemente, 0,5 a 1 mm. - - - -

15. La misma es a continuación secada a aproximadamente 92% de materias secas o más, preferentemente con un contenido en materias secas comprendido entre 94 y 97%, por un secado particularmente cuidadoso. Puede tratarse de un secado neumático rápido, de un secado por lecho fluidizado o de una combinación de estos dos modos de secado. Preferentemente, el secado se conducirá de manera que la temperatura de la levadura no sobrepase de 30°C al principio del secado y 40°C al final del secado. - - - - -

20. Para permitir comprender mejor la invención, se describe a continuación, con la ayuda de algunos ejemplos, la obtención de algunas cepas de acuerdo con la invención, la preparación de levaduras frescas y secas a partir de es-

tas cepas y las propiedades de las levaduras frescas y secas así obtenidas. - - - - -

EJEMPLO 1

5. Se hacen reproducir por esporas dos cepas rápidas, adaptadas a la maltosa, estables al secado, depositadas por el solicitante en la N.C.Y.C. bajo los números N.C.Y.C. 875 y N.C.Y.C. 876. - - - - -

10. Se hacen reproducir por esporas dos cepas lentas, muy osmotolerantes, es decir de muy alto rendimiento en pastas azucaradas, depositadas por el solicitante en la N.C.Y.C. bajos los números R 30 y N.C.Y.C. 877. - - - - -

15. Se aislan para cada grupo de cepas 10 haploides de mating tipo a y 10 haploides de mating tipo alfa. Se conjugan a continuación por mass-mating cada haploide de un grupo con todos los haploides de mating tipo opuesto del otro grupo. Se obtienen así 196 híbridos. - - - - -

Se ensayan estos 196 híbridos con el primero, el segundo, el tercer tests de screening y el cuarto test de screening. - - - - -

20. Las curvas de crecimiento del primero y segundo tests se realizan en unos matraces ópticos, matraces provistos de un tubo calibrado que permite una lectura en el colorímetro sin extracción del medio. El medio del cultivo YEP

está compuesto de extracto de levadura 1%, de peptona 2% y de sacarosa 2% y es inseminado con 0,3 a 0,5 ml de un pre-cultivo agitado del híbrido a ensayar en medio líquido al 1% de azúcar. - - - - -

5. El segundo test se practica adicionando al medio de cultivo del primer test ácido acético glacial a razón de 0,13 ml y 0,14 ml, o sea 0,433% y 0,466%. - - - - -

10. El tercero y el cuarto tests se practican sobre levadura recogida por centrifugación o filtración al final del cultivo practicado en el marco del primer test. La levadura recogida es lavada para eliminar la cantidad de azúcar del medio de cultivo, azúcar que podría falsear los resultados del tercer test. - - - - -

15. El tercer test se practica en medio tampón fosfato 0,01 m, pH 6,5, comprendiendo la mezcla de reacción: - -

Levadura	20 a 25 mg de materias secas
glucosa	4 mg
maltosa	2 mg

20. La reacción se realiza a 30°C durante 1 hora, y es parada por brusco enfriamiento y centrifugación en frío. La dosificación del azúcar sobrenadante se realiza por el método colorimétrico con la antrona. - - - - -

El cuarto test se practica sobre 0,1 a 0,4 mg de

materias secas de levadura que son puestas en presencia de sacarosa con concentración final 0,1 molar en un tubo de ensayo en medio tamponado al tampón acetato con pH 4,7, colocado en un baño maría a 30°C. Al cabo de 5 minutos, la reacción de inversión de la sacarosa es bloqueada por adición del reactivo al dinitrosalicilato de sodio que sirve para dosificar los azúcares reductores formados por reacción colorimétrica. - - - - -

5.

10.

Se determina, en el marco del primer test de screening, el coeficiente μ : incremento de población por unidad de tiempo y por unidad de masa de población para unas cepas rápidas de levadura del comercio o las cepas de partida, siendo el valor testigo hallado designado por μ_t .

15.

En el marco del primer test, se eliminan todos los híbridos para los cuales: - - - - -

$$\mu < 0,9 \mu_t.$$

En el marco del segundo test, se constata que todas las cepas rápidas, adaptadas a la maltosa empleadas tienen un: - - - - -

μ en 0,433% de ácido acético $< 0,4 \mu_t$ y un μ en 0,466% de ácido acético $< 0,25 \mu_t$

pero que una cepa lenta muy osmotolerante y bastante poco sensible al ácido acético, como la cepa N.C.Y.C. R 30, tie-

ne un: - - - - -

μ en 0,433% de ácido acético $> 0,6 \mu_t$ y un

μ en 0,466% de ácido acético $> 0,4 \mu_t$

5. En el marco de este segundo test, se considerará que deben considerarse para examen ulterior todas las cepas que dan: - - - - -

μ en 0,433% de ácido acético $> 0,55 \mu_t$ y un

μ en 0,466% de ácido acético $> 0,32 \mu_t$.

10. En el marco del tercer test, se constata que las cepas rápidas consideradas como adaptadas a la maltosa, consumen 60-80% de la maltosa presente, pero que, por el contrario, una cepa lenta como la N.C.Y.C. R 30 consume menos del 20% de la maltosa presente. En el marco de este test, se eliminan todas las cepas que consumen menos de 35% de la maltosa presente y se retienen las cepas que consumen más del 60% de la maltosa presente. Las cepas que consumen entre 35% y 60% de la maltosa presente no son consideradas más que si han sido consideradas según los criterios del segundo test o según los criterios del cuarto test. - - - - -
- 15.

20. En el cuarto test, se consideran todas las cepas que titulan menos de 35 unidades invertasa y, preferentemente, menos de 30 unidades invertasa y, más preferentemente aún, menos de 20 unidades invertasa. - - - - -

En el marco de la selección tal como se ha descrito anteriormente, se consideran 10 híbridos de los 196 obtenidos por cruces. - - - - -

5. Es destacable que los híbridos seleccionados tienen las propiedades siguientes: - - - - -

- curva de crecimiento equivalente a los testigos en el primer test, - - - - -
- adaptación a la maltosa caracterizada por un consumo de por lo menos 35% de la maltosa presente en el segundo test, es decir por lo menos 50% de la maltosa consumida por las cepas rápidas testigo adaptadas a la maltosa, - - - - -

- 10. - contenido en invertasa inferior a 35 unidades y, preferentemente, inferior a 30 unidades y, aún más preferentemente, inferior a 20 unidades en el cuarto test, o/de preferencia un crecimiento en presencia de ácido acético caracterizado por un: μ en 0,433% de ácido acético $> 0,55 \mu_t$ o/y un μ en 0,466% de ácido acético $> 0,32 \mu_t$,

- 15. es decir una inhibición menor en presencia de ácido acético que las cepas rápidas testigo adaptadas a la maltosa, - - - - -

- 20. son unas cepas nuevas para la producción de levadura de panadería, no reuniendo ninguna cepa autorizada en la industria de la levadura de panadería estas tres o cuatro características. - - - - -
- 25.

Estos 10 híbridos seleccionados son a continuación ensayados por medios clásicos: - - - - -

5. . cultivo en fermentadores de 3 litros tales como los descritos en Yeast Technology, J. WHITE (1954), páginas 103 a 106 donde el medio de cultivo tiene un volumen total de 1100 ml, el azúcar es aportado en forma de melaza, el aire es filtrado en membrana del tipo Millipore a razón de 1 m³/hora y la inseminación se realiza por 300 mg de levadura obtenida por cultivo anaerobio en matraces, - - -
10. . cultivo aéreo y agitado en batería de fermentadores New Brunswick Scientific Co. de volumen total 5 litros y de volumen útil 3 a 3,5 litros, después secado de las levaduras obtenidas, - - - - -
15. . o cultivo en batería de fermentadores piloto de volumen útil 80 litros, tales como los descritos en el ejemplo 2 de la patente francesa nº 75 20943, después secado. - - - - -

- Los cultivos en la fase fermentador de 3 litros
20. tipo WHITE ponen en evidencia que 5 de los 10 híbridos seleccionados presentan unas características particularmente interesantes. Se dan en la tabla I los resultados obtenidos en la misma serie de experimentos para estos 5 híbridos, varios híbridos de levadura rápida adaptados a la maltosa, tomados
 25. como testigos, y una cepa lenta, a saber la N.C.Y.C. R 30 que es particularmente de alto rendimiento. - - - - -

TABLA I

Cepas utilizadas	Unidades invertasa	Test A ₁ hora	Test A ₂	Test A ₃	Test A ₄
Testigos (Híbridos de levadura rápida adaptados a la maltosa)	45 a 140	57	64	46	8 a 16
N.C.Y.C. R 30	25	29	46	56	26
Híbrido 1	23	52	61	55	24
Híbrido 2	37	58	68	51	17
Híbrido 3	35	65	72	56	18
Híbrido 4	32	56	67	62	23
Híbrido 5	29	52	62	60	25

Después de test en baterías de fermentadores de volumen más importante y después de ensayos en fábricas, son los híbridos 3 y 5 que han sido considerados y depositados en la N.C.Y.C. - - - - -

5. El híbrido nº 3 ha recibido el número N.C.Y.C. 848, el híbrido nº 5 ha recibido el número N.C.Y.C. 847. - -

10. Se dan en la tabla II los resultados obtenidos para estos dos híbridos en fábrica después de cultivo de 100 m³ que conducen a recoger aproximadamente 25 toneladas de levadura fresca, llevada de manera que se obtenga: - - - - -

• un contenido de nitrógeno sobre materias secas de aproximadamente 8%, - - - - -

- . un contenido de P_2O_5 sobre materias secas de aproximadamente 2,3%, - - - - -
- . un contenido de trealosa sobre materias secas de aproximadamente 13%, - - - - -
- 5. . un porcentaje de grumos del orden de 1%, - - -
- . un descenso crioscópico del agua externa de la levadura del orden de 0,3°C. - - - - -

Se dan a título de comparación los resultados obtenidos con un híbrido de levadura rápida adaptado a la maltosa y la N.C.Y.C. R 30 (tabla II en lo que concierne a la levadura fresca y tabla III en lo que concierne a la levadura seca). - - - - -

TABLA II

Cepa	LEVADURAS FRESCAS								
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	B ₁		B' ₃	
						1 h	3 h	1 h	3 h
Híbrido de levadura rápida adaptado a la maltosa	55+80=135	59	49	22	28	350	1700	60	400
NCYC R 30	37+48= 85	52	56	40	33	260	1200	120	650
NCYC 848	60+80=140	64	53	33	53	420	1780	200	1160
NCYC 847	55+75=130	63	57	37	50	400	1700	250	1200

TABLA III

Cepa	LEVADURAS SECAS								
	A' 1	A' 2	A' 3	A' 4	A' 5	B ₁		B' 3	
						1 h	3 h	1 h	3 h
Híbrido de levadura rápida adaptado a la maltosa	48+70=118	50	41	18	24	300	1500	45	300
NCYC R 30	32+43= 75	45	47	32	29,5	230	1050	90	500
NCYC 848	51+68=119	53	45	25	43	350	1550	120	830
NCYC 847	46+61=107	53	48	28	38	300	1470	110	830

Las principales características taxonómicas de las cepas de *Saccharomyces Cerevisiae* N.C.Y.C. 847 y N.C.Y.C. 848 están relacionadas en la tabla VI. - - - - -

EJEMPLO 2

5. Para probar de obtener unas cepas de bajo contenido de invertasa, se cruzan los haploides de las cepas lentas obtenidas en el marco del ejemplo 1 que han parecido más interesantes, con unos haploides de cepas rápidas adaptadas a la maltosa que han sufrido un tratamiento de mutación destinado a descender su contenido en invertasa. - - - - -
- 10.

El tratamiento mutágeno es conducido de la manera siguiente: - - - - -

La cepa haploide que proviene de un precultivo fresco es puesta de nuevo en medio de cultivo y llevada a la fase exponencial de crecimiento. La levadura es recogida estérilmente por centrifugación y puesta de nuevo en suspensión en un tampón Tris de pH 6,6. La concentración final en células será de 10^7 a 10^8 células por ml. El agente mutágeno nitrosoguanidina es adicionado con una concentración final de 200 a 400 microgramos/ml. - - - - -

5.

La reacción se realiza a 30°C durante un tiempo de 15 a 60 minutos. Al final de la reacción, después de dilución con una gran cantidad de agua salada, se centrifuga en frío. Las células haploides tratadas son entonces llevadas a dilución conveniente y colocadas en medio gelosado en caja de Petri. Se obtienen, según las cepas haploides tratadas, unos porcentajes de supervivencia de 10 a 80%. - - - - -

10.

15.

Se consideran para screening los haploides tratados en los tratamientos que han dado una supervivencia superior al 40%. - - - - -

Se emplean como test de screening, para seleccionar estos haploides, el primer test y el cuarto test: contenido en invertasa inferior a 20 unidades. - - - - -

20.

Se conduce este trabajo hasta la obtención de: -

- 5 haploides mutantes de mating tipo a
- 5 haploides mutantes de mating tipo α

que respondan positivamente a estos dos Test y para los cuales se ha verificado, por medio del tercer test, que conservan su característica de adaptación a la maltosa. - - - - -

Se cruzan estos híbridos con: - - - - -

- 5. - 6 haploides salidos de las cepas lentas de mating tipo a,
- 4 haploides salidos de las cepas lentas de mating tipo c

- Se obtienen así 50 híbridos que se ensayan con la ayuda del primer test, del cuarto test (contenido en invertasa inferior a 20 unidades) y del tercer test como se ha descrito en el ejemplo 1. - - - - -
- 10.

Gracias a estos tests de screening se seleccionan 7 híbridos. - - - - -

- Después de cultivo WHITE, ensayos en fermentadores NEW BRUNSWICK y ensayos a escala industrial, se considera 1 híbrido. Este híbrido ha sido depositado en la N.C.Y.C. bajo el número N.C.Y.C. 878. Los resultados obtenidos con este híbrido en ensayos en fermentadores tipo WHITE de 3 litros y ensayos industriales están relacionados en la tabla IV. -
- 15.

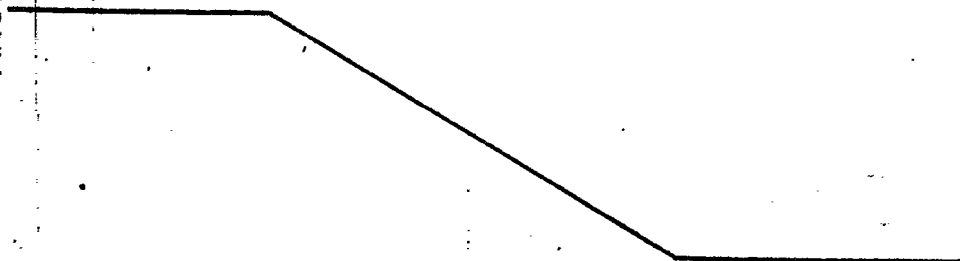


TABLA IV

	inver tasa	Test A ₁		Test A ₂	Test A ₃	Test A ₄	Test A ₅
		1 hora	2 horas				
Resultados levaduras con 32% de materias secas después de cultivo en fermentadores tipo WHITE	15	43		53	61	28	
Resultados levaduras frescas después de ensayos industriales	5	42 + 70 = 112		53	61	44	35
		Test A' ₁		A' ₂	A' ₃	A' ₄	A' ₅
Resultados levaduras secas después de ensayos industriales		37 + 62 = 99		47	48	35	31

EJEMPLO 3

Se hacen reproducir por esporas las cepas más interesantes obtenidas en los ejemplos 1 y 2. - - - - -

5. Se cruzan los haploides obtenidos a partir de estas nuevas cepas de levadura con los haploides de más alto rendimiento, es decir los que han conducido una o, preferentemente, varias veces a unas cepas seleccionadas. - - - - -

Se efectúan así 110 cruces que conducen a 21 híbridos considerados después de selección según el primer test,

el cuarto test y el tercer test, los tres utilizados como en el ejemplo 1. - - - - -

5. Después de ensayos, se consideran dos híbridos en definitiva y han sido depositados en la N.C.Y.C. con los números N.C.Y.C. 879 y N.C.Y.C. 880. - - - - -

10. Los resultados obtenidos con estos híbridos en ensayos en fermentadores tipo WHITE de 3 litros están relacionados en la tabla V siguiente. Sus características taxonómicas están relacionadas en la tabla VI. Los 5 híbridos depositados en el marco de estos ejemplos han sido todos identificados como unos Saccharomyces Cerevisiae por la N.C.Y.C. - - - - -

TABLA V

Resultados con cultivo en fermentadores tipo WHITE	Invertasa	Test A ₁ 1 hora	Test A ₂	Test A ₃	Test A ₄
N.C.Y.C. 879	21	48	58	63	28
N.C.Y.C. 880	16	42	54	64	31

15. Estas dos cepas N.C.Y.C. 879 y 880 tienen unas propiedades próximas a la cepa N.C.Y.C. 878, es decir que son más rápidas en todos los test que la N.C.Y.C. R 30, comprendido el test A₄ que corresponde a una pasta muy azucarada. -

EJEMPLO 4

A todo lo largo del trabajo descrito en los ejemplos 1 a 3, se han llegado a reconocer un cierto número de haploides de alto rendimiento en particular que conducen a unos híbridos seleccionados y reconocidos a continuación como que tienen propiedades interesantes nuevas. - - - - -

5 de estos haploides particularmente de alto rendimiento han sido depositados en la N.C.Y.C. Estos son los haploides: - - - - -

- 10. - Ha 1 haploide de mating tipo a que ha recibido el nº N.C.Y.C. 881
- Ha 2 haploide de mating tipo a que ha recibido el nº N.C.Y.C. 882
- Hα 3 haploide de mating tipo α que ha recibido el nº N.C.Y.C. 883
- 15. - Hα 4 haploide de mating tipo α que ha recibido el nº N.C.Y.C. 884
- Hα 5 haploide de mating tipo α que ha recibido el nº N.C.Y.C. 885

Estos haploides han sido obtenidos por reproducción por esporas de cepas de Saccharomyces Cerevisiae. - - -

Estos haploides cultivados en fermentadores tipo WHITE han dado los resultados siguientes: - - - - -



	Contenido de invertasa	Test A ₁ en 1 hora	Test A ₄ en 1 hora	$\frac{\text{Resultado del test A}_3}{\text{Resultado del test A}_2} \times 100$
Ha ₁	18	41	29	121
Ha ₂	11	29	17	109
Hd ₃	85	50	13	75
Hd ₄		33	15	89
Hd ₅	13	26	35	139

Los dos primeros haploides Ha₁ (N.C.Y.C. nº 881) y Ha₂ (N.C.Y.C. nº 882) son particularmente destacables: - -

5. - puesto que tienen caracteres rápidos, es decir de adaptación a la maltosa y osmotolerantes, es decir de adaptación a los fuertes contenidos de azúcar, - - - - -

- puesto que imponen el carácter invertasa bajo después de conjugación, es decir que dan sistemáticamente unas cepas diploides con invertasa baja. - - - - -

10. Dan resultados interesantes tanto cuando son conjugados con haploides salidos de levaduras rápidas como cuando son conjugados con haploides salidos de levaduras lentas.

15. Los dos haploides Hd₃ (N.C.Y.C. nº 883) y Hd₄ (N.C.Y.C. nº 884) son ejemplos interesantes y de alto rendimiento de haploides salidos de levaduras rápidas no osmotolerantes. - - - - -

El haploide H₅ es un buen ejemplo de un haploide que tiene unas características de muy buena adaptación a las pastas azucaradas. -----

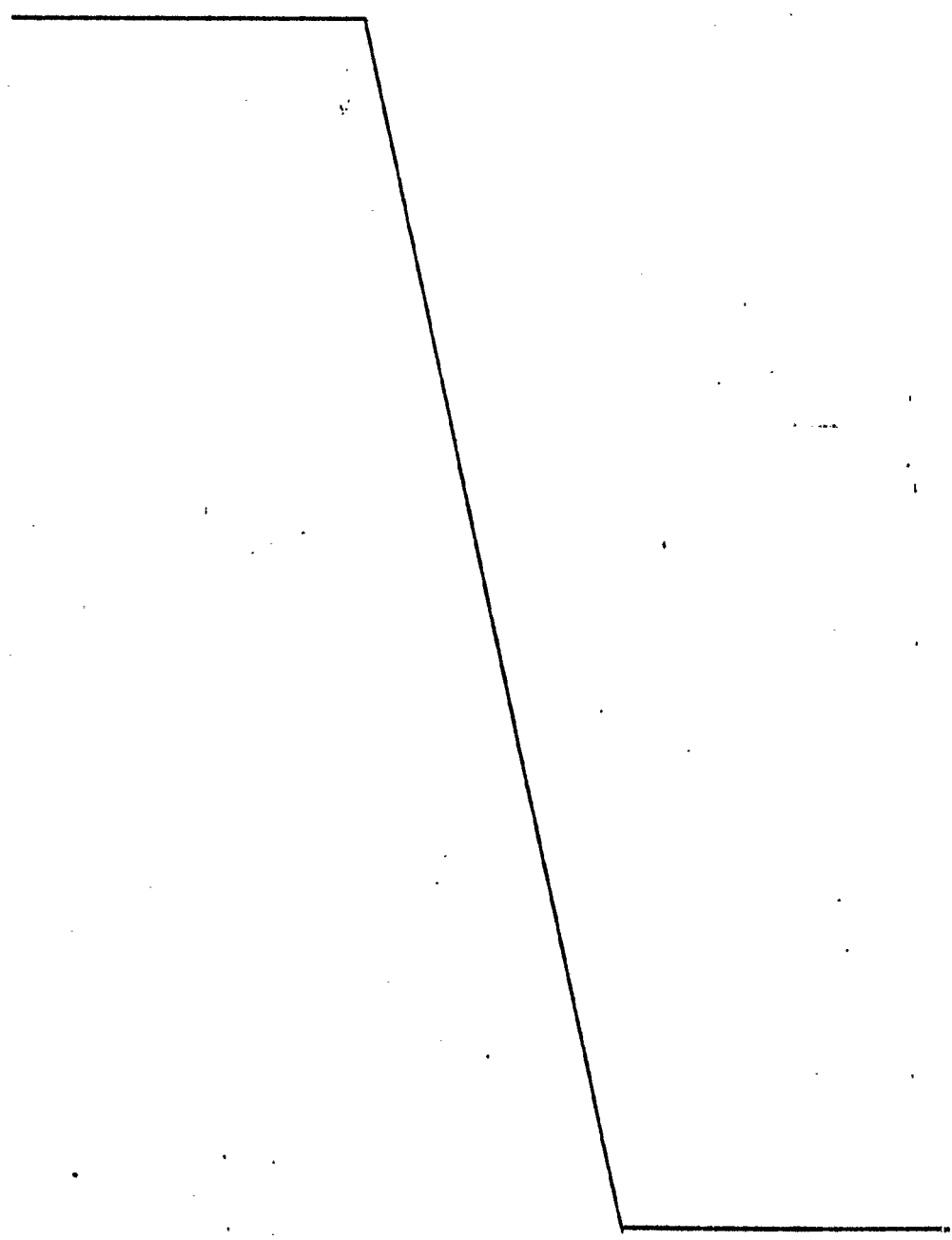


TABLA VI

Resultados de los tests de identificación efectuados por la NCYC (National Collection of Yeast Cultures) en las cepas depositadas

Indicación de algunos resultados particulares de cada cepa

Cepas ensayadas	Resultado de la identificación	Tamaño de las células en micrones			Número de ascosporas por asca	Fermentación de la galactosa	A s i m i l a c i ó n					Crecimiento en medio sin vitaminas	
		Medio líquido 24 h	Medio líquido 72 h	Medio sólido 72 h			Trealosa	Melecitosa	Inulina	Eritrol	α metil-glucosido		
NCYC 847	Saccharomyces Cerevisiae	(3,5-5) x (6,5-9)	(2-5) x (3,5-7,5)	(2-4) x (3-7)	1 a 4	+	+	+	+	-	-	+	-
NCYC 843	Saccharomyces Cerevisiae	(2,5-4,5) x (4,5-6,5)	(3-4,5) x (4-7)	(2,5-4,5) x (3-8)	1 a 4	+	+	+	+	-	-	+	(débilmen- tet)
NCYC 878	Saccharomyces Cerevisiae	(3-5) x (5-8)	(2,5-5) x (4-6)	(2-4) x (4-8)	1 a 4	+	+	+	+	-	-	+	-
NCYC 879	Saccharomyces Cerevisiae	(3-5,5) x (4-7)	(2-6) x (3-8,5)	(3-5) x (3-7)	1 a 4	+	+	+	+	-	-	+	+
NCYC 880	Saccharomyces Cerevisiae				2 a 4	+	Latente	+	+	-	-	+	+
NCYC 875	Saccharomyces Cerevisiae		(3,6-6) x (4-8)	(1,5-5,5) x (3,5-8)	1 a 4	+	+	+	+	-	-	+	-
NCYC 876	Saccharomyces Cerevisiae		(3-7) x (4-10)	(3-5) x (4-11)	1 a 4	+	+	+	+	-	-	+	-
NCYC 877	Saccharomyces Cerevisiae		(2-4,5) x (3-6)	(1,5-4,5) x (2,5-8)	2	+	+	+	+	-	-	+	débil
NCYC R30	Saccharomyces Cerevisiae	(1,5-8) x (2-7)	(1,5-5) x (2-6)	(2,9-8) x (2,5-7)	1 a 2 3 semanas	+	+	-	-	-	-	+	-

NOTAS: Las 4 cepas descritas han sido caracterizadas como pertenecientes a la especie *Saccharomyces Cerevisiae*

Los otros caracteres descritos en esta tabla son caracteres secundarios, sin significación tecnológica

Su reproductibilidad en el marco de los tests practicados (tests de J. LODDER) no está siempre asegurada.

Este último ejemplo hace aparecer que los tests de screening descritos conducen rápidamente a definir unos haploides particularmente de alto rendimiento, que pueden imponer características buscadas como por ejemplo un bajo contenido en invertasa. - - - - -

5.

Estos haploides seleccionados, debido a que han conducido una o, preferentemente, varias veces a cepas diploides seleccionadas, representan un material genético de partida particularmente interesante. Los mismos pueden ser caracterizados por los tests clásicos según sus propiedades como haploides, y, de una manera aún más interesante, según las propiedades que confieren a los haploides después de cruce.-

10.

A continuación de lo cual y cualquiera que sea el modo de realización adoptado, se dispone así: - - - - -

15.

- por una parte, de nuevas cepas de levaduras, - -

- por otra parte, de levaduras frescas y comprimidas obtenidas a partir de estas nuevas cepas y que constituyen unos productos industriales nuevos, - - - - -

estas nuevas cepas, así como las levaduras frescas y secas que de ellas se derivan presentan, con respecto a las que existen ya, las numerosas ventajas expuestas en la descripción. - - - - -

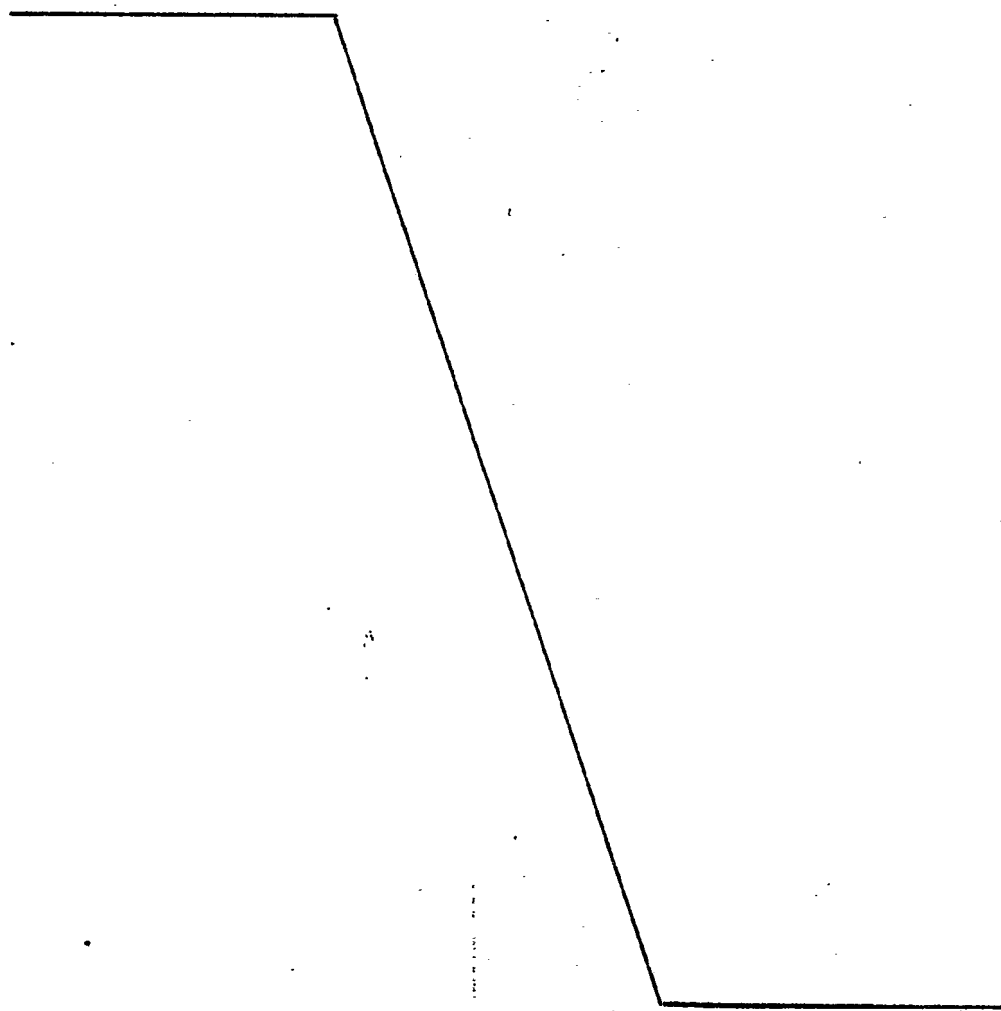
20.

Desde luego y como resulta además de lo que prece

de, la invención no se limita en modo alguno a aquellos modos de realización y de adaptación que han sido más especialmente previstos sino que abarca, por el contrario, todas las variantes. - - - - -

5.

A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la obtención de nuevas cepas de levaduras, caracterizado porque, por medio del primero y de por lo menos otro test de screening elegidos en un conjunto de tests de screening en que no se recurre a ninguna medición de desprendimiento gaseoso, se seleccionan las cepas buscadas a partir de un conjunto de cepas diploides preparadas previamente o bien por hibridación o bien por mutación de cepas existentes, estando los tests de dicho conjunto constituidos por: - - - - -
5. - un primer test que consiste en medir el coeficiente de multiplicación medio de una cepa dada siguiendo la variación de la densidad óptica de un medio standard insemiado por una suspensión de células obtenidas a partir de esta cepa, - - - - -
10. - un segundo test que consiste en medir de la misma manera el coeficiente de multiplicación medio de dicha cepa en presencia de un ácido inhibidor adicionado al medio standard, - - - - -
15. - un tercer test que consiste en medir la adaptación a la maltosa de dicha cepa en presencia de glucosa por determinación de la cantidad de maltosa subsistente en un medio standard después de que una cantidad conocida de glucosa
- 20.

Handwritten mark

adicionada a este medio haya sido completamente consumida, -

- un cuarto test que consiste en dosificar el conte
nido de invertasa de dicha cepa, - - - - -

5. - un quinto test que consiste en medir el tiempo
de latencia de dicha cepa. - - - - -

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracte-
rizado porque la hibridación consiste esencialmente en cru
ces sistemáticos de haploides salidos de cepas de Saccharomy-
ces Cerevisiae rápidas adaptadas a la maltosa y de haploides
salidos de cepas muy lentas, no adaptadas a la maltosa, pero
bien adaptadas a las pastas azucaradas en su caso también a
las pastas ácidas, que pertenecen al género Saccharomyces y,
particularmente, a la especie Saccharomyces Cerevisiae. - -

15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracte-
rizado porque la mutación de cepas existentes consiste
esencialmente en una mutagénesis efectuada sobre haploide o
sobre diploide y utilizando agentes mutágenos del grupo que
comprende el etilmetano sulfonato y la N-metil, N-nitro, N-
nitrosoguanidina o NTG, pudiendo los haploides obtenidos al
20. final del tratamiento mutágeno ser utilizados entonces como
material de cruce en los trabajos de hibridación. - - - -

4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracte-
rizado porque las cepas rápidas adaptadas a la maltosa uti

129

lizadas son las depositadas en la N.C.Y.C. bajo los nos. 875 y 876 y porque las cepas lentas son las depositadas en la N.C.Y.C. bajo los nos. R 30 y N.C.Y.C. 877. - - - - -

5. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se utiliza como material genérico de partida los haploides para los cuales los ensayos de cruce sucesivos han mostrado que conducen generalmente a unas cepas diploides seleccionadas por los tests de screening, estando estos haploides caracterizados según sus propiedades como haploides y según las propiedades que confieren a los diploides después de cruce. - - - - -

15. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque uno de los haploides utilizados como material genético de partida es el haploide Ha₁ depositado en la N.C.Y.C. bajo el nº 881. - - - - -

7.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque uno de los haploides utilizados como material genético de partida es el haploide Ha₂ depositado en la N.C.Y.C. bajo el nº 882. - - - - -

20. 8.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque uno de los haploides utilizados como material genético de partida es el haploide Ha₃ depositado en la N.C.Y.C. bajo el nº 883. - - - - -

129

9.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque uno de los haploides utilizados como material genético de partida es el haploide $H\alpha_4$ depositado en la N.C.Y.C. bajo el nº 884. - - - - -

5. 10.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque uno de los haploides utilizados como material genético de partida es el haploide $H\alpha_5$ depositado en la N.C.Y.C. bajo el nº 885. - - - - -

10. 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque se realiza la selección utilizando de forma conjugada el primer test de screening (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente un coeficiente de multiplicación equivalente al de las mejores cepas de levadura de panadería del comercio), el tercer test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente una adaptación a la maltosa que corresponda a una cantidad de maltosa consumida igual a por lo menos 50% de la maltosa consumida en el modo operatorio considerado para las mejoras cepas de levadura del comercio adaptadas a la maltosa) y el cuarto test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente un contenido de invertasa inferior a 35 unidades). - - - - -

15.

20.

12.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el criterio considerado en el cuarto test es un contenido de invertasa inferior a 30 unidades y, prefe

pa

rentemente, inferior a 20 unidades invertasa. - - - - -

- 5. 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque se realiza la selección utilizando de forma conjugada el primer test de screening (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente un coeficiente de multiplicación equivalente al de las mejores cepas de levadura de panadería del comercio), el tercer test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente una adaptación a la maltosa correspondiente a una cantidad de maltosa consumida igual a por lo menos 50%
- 10. de la maltosa consumida por las mejores cepas adaptadas a la maltosa) y el segundo test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente una inhibición menor del cultivo en presencia de ácido acético adicionado al medio
- 15. standard). - - - - -

- 20. 14.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque se realiza la selección utilizando además el cuarto test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente un contenido de invertasa inferior a 35 unidades). - - - - -

15.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque se realiza la selección utilizando además el cuarto test (siendo el criterio considerado que toda cepa seleccionada presente un contenido de invertasa inferior a

30 unidades y, preferentemente, inferior a 20 unidades inver
tasa). -----

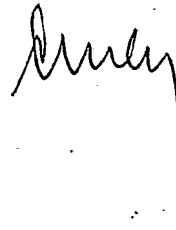
16.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE NUEVAS
CEPAS DE LEVADURAS". -----

5.

Todo ello conforme se describe y reivindica en la
presente memoria que consta de cincuenta y cinco hojas folia
das y mecanografiadas por una sola de sus caras.

BARCELONA, 23 DIC. 1977

P.A. M. CURELL SUÑOL



mcm.