



ESPAÑA

**PATENTE DE INVENCION**

NUMERO	473523
FECHA DE PRESENTACION	24.12.1976

10 A1

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

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C13K	466.015

64 TITULO DE LA INVENCION
"Método de producción de levadura de panadería y similares"

71 SOLICITANTE (S)
LESAPFRE ET CIE

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

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

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
M. Curell Suñol

GK/PCO D. 466015 594 78-D  
EX-FR

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

por VEINTE años

solicitada en España a favor de LESAFFRE ET CIE, de nacionalidad francesa, domiciliada en 41, rue Etienne Marcel,  
5.      75001 París, Francia, por "Método de producción de levadura de panadería y similares", con prioridad de la solicitud británica 54172/1976 de fecha 24 Diciembre 1976. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

La invención tiene por objeto un método de producción de levaduras de panificación y similares. - - - - -  
10.

Se conocen ya unas cepas rápidas adaptadas a la maltosa -es decir que permiten preparar levaduras que dan un desprendimiento de CO<sub>2</sub> 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.-  
15.

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. 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. - - - - -

10. 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  
15. una parte no negligible de la panificación. - - - - -

Finalmente, en todos los países, se adicionan a los productos de panificación destinados a tener una larga conservación o una conservación en condiciones difíciles,  
20. 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, 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. - - - - -

5. 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, de nuevas cepas adaptadas a la maltosa, caracterizadas porque  
10. 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, - - - - -

15. - 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, - - -

20. - 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: - - - - -

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

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

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. - - - - -

10. 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 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 ejemplo 1 de la solicitud de patente francesa no. 75 20943, 15. (que corresponde a la patente española 444.558 presentada el 8 julio 1976), la recogida de esta levadura y por lo menos 20. 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.

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. - - - - -

10.

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

15.

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 tests de screening en que no se recurre 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.

- 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 inseminado por una suspensión de células obtenidas a partir de es

ta 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,

5.

- 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, -

10.

- 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 plasmolisis de la levadura, o bien un semi-micromol de sacarosa invertida, - - - - -

15.

- 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%. - - - - -

20.

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: - - - - -

5.

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

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

10.

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 m $\mu$ . - - - - -

A partir de esta curva, se puede calcular el coeficiente de multiplicación medio  $\mu$  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 senti

do 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 desprendi mientos gaseosos muy pequeños, como por ejemplo las cepas de masiado penalizadas cuando tiene lugar un tratamiento de mutación. - - - - -

5. Siempre en el mencionado procedimiento, para el se gundo test, el ácido inhibidor adicionado al medio de culti vo consiste en una mezcla de ácido acético y de ácido lácti co en cantidad y en proporciones tales que inhibe a un por centaje comprendido entre 50% y 90% el crecimiento de una ce pa testigo que presenta sobre pasta que contiene ácidos orgá nicos inhibidores y/o sobre pasta azucarada una disminución importante de su poder de desprendimiento de CO<sub>2</sub>. - - - - -

10. Se ha hallado, en efecto, que existía una probabi lidad no negligible para que las cepas que, en un medio que contiene una cantidad de ácido acético apropiada para inhi bir en una gran proporción el crecimiento de los híbridos conocidos de levaduras rápidas adaptadas a la maltosa, pre senten un crecimiento mejor que estos híbridos, - - - - -

20. - o sean la sede de una inhibición menor en fermen tación sobre pastas ácidas (más de 50% de probabilidades), -

- o bien de mayor rendimiento y, a menudo, incluso

netamente de más rendimientos en pastas azucaradas que dichos híbridos rápidos, adaptados a la maltosa. - - - - -

5. 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.
10. - - - - -
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. - - - - -

- 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%. - - - - -
- 5.
- 10.

- 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. - - - - -
- 15.
- 20.

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
5. 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 mi- nutos, la reacción de inversión de la sacarosa es bloqueada
10. por adición del reactivo al dinitrosalicilato de sodio que sirve para dosificar los azúcares reductores formados por reacción colorimétrica. - - - - -

- La mayor o menor riqueza en invertasa puede ser también apreciada de una manera semicuantitativa sobre colo- nias de las cepas ensayadas sobre placa de Petri, recubrien- do 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-dianisi- dina por ejemplo). Este test es una primera aproximación po- sible, esencialmente después de mutación. Puede, en algunos
15. casos, permitir una primera selección muy basta. De todas ma- neras, el método simple y práctico descrito anteriormente debe siempre ser empleado para afinar esta primera selección.

- Se ha hallado que existe una gran probabilidad de que todas las cepas de levadura que tengan menos de 35 uni- dades invertasa, preferentemente menos de 30 unidades y, más
- 25.

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 test 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 me

- jores cepas de levadura de panadería del comercio, 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 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 preferente aún inferior a 20 unidades) conduce a unas cepas mejor adaptadas a la maltosa o/y de más rendimientos en pastas azucaradas. - - - - -
- 5.
- 10.

- Todas las cepas así seleccionadas tienen características nuevas con respecto a todas las cepas previamente conocidas. - - - - -
- 15.

- 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 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
- 20.
- 25.

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. - -

5.

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: - - - - -

10.

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

15.

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

20.

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 pri-

mer 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. - - - - -

10. Siendo así y siempre en el mencionado procedimiento, la hibridación de acuerdo con la invención consiste esencialmente en cruces sistemáticos de haploides salidas de cepas de *saccharomyces cerevisiae* rápidas adaptadas a la maltosa y de haploides salidas de cepas muy lentas, no 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*. - - - - -

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 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

25.

(American Type Culture Collection), la CBS (Centraalbureau voor Schimmel Cultures de Baarn) o la NCYC (National Collection of Yeast Cultures) no es ni limitativa, ni completa. - - - - -

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

10. 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 capítulo 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. - - -

5. 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. - - - - -

10. Se ha verificado que la gran mayoría de las levaduras 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. - - - - -

20. 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-nini

25.

trosoguanidina o NTG, pudiendo los haploides obtenidos al final del tratamiento mutágeno ser entonces utilizados como material de cruce en los trabajos de hibridación. - - - - -

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

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

15. 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: - - - - -

20. - 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,

5. - 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. - - - - -

10. 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 (A<sub>1</sub>, A'<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A'<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A'<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A'<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>, A'<sub>5</sub>) realizados con la ayuda del fermentómetro de
15. BURROWS y HARRISON y por las referencias B (B<sub>1</sub>, B'<sub>1</sub>, y B'<sub>3</sub>) realizados con la ayuda del zimotaquígrafo CHOPIN y que serán definidos a continuación. - - - - -

- Test A<sub>1</sub> (levaduras comprimidas frescas)

20. - 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<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 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.

- 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. - - - - -

10.

- Test A₂ (levaduras comprimidas frescas)

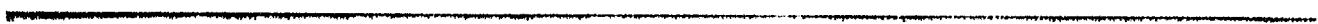
- Ensayo idéntico al ensayo A₁, pero se adicionan a la harina 100 mg de sacarosa; la cantidad total de gas producido es medida después de 60 minutos. - - - - -

15.

- 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. - - - - -

20.



- Test A<sub>3</sub> (levaduras comprimidas frescas)

- Ensayo idéntico al ensayo A<sub>1</sub>, pero se adicionan a la harina 2 g de sacarosa; la cantidad total de gas producida es medida después de 60 minutos. - - - - -

5. - Test A'<sub>3</sub> (levaduras secas)

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

- Test A<sub>4</sub> (levaduras comprimidas frescas)

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

- Test A'<sub>4</sub> (levaduras secas)

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

- Test A<sub>5</sub> y A'<sub>5</sub>

20. - Ensayos idénticos respectivamente a los ensayos A<sub>1</sub> y A'<sub>1</sub>, con la diferencia de que se adiciona a la suspensión de levadura, justo antes de la adición de ésta a la ha

rina, 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. - - - - -

5. - Test B<sub>1</sub> (levaduras comorimidadas 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. - - - - -

15. - Test B'<sub>1</sub> (levaduras secas que deben ser rehidratadas)

20. - Ensayo idéntico al ensayo B<sub>1</sub>, 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'<sub>3</sub>

5. - Ensayo idéntico al ensayo B'<sub>1</sub>, 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 CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> en 2 horas, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 135 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> y a 1.700 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub>, - - - - -

20. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 53, preferentemente a 55 ml de CO<sub>2</sub> en 1 hora en el test A<sub>2</sub> y, más preferentemente aún, igual o superior a 60 ml en este

test en 1 hora, - - - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 50 ml de CO<sub>2</sub> en 1 hora en el test A<sub>3</sub> y, preferentemente, igual o superior a 55 ml en el test A<sub>3</sub> en 1 hora, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 25 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>4</sub> y, preferentemente, igual o superior a 30 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>4</sub> en 1 hora y, más preferentemente aún, igual o superior a 35 ml de CO<sub>2</sub>, - - - - -

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 CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> en 2 horas, superior o igual a 1.350 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> y a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas. - - -

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

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 44

ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>3</sub> y, preferentemente, igual o superior a 47 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>3</sub>, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 21 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>4</sub> y, preferentemente, igual o superior a 26 ml de CO<sub>2</sub>. - - - - -

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 CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> en 2 horas e igual o superior a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 135 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> y a 1.700 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub>, - - - - -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 40 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>5</sub> en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 45 ml de CO<sub>2</sub> en este test A<sub>5</sub> en 1 hora, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 900 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 1.000 ml de CO<sub>2</sub> en este test B'<sub>3</sub> en 3 horas. - - - - -

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

5. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 100 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> en 2 horas, superior a 1.350 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> y a 1.500 ml de el test B<sub>1</sub> en 3 horas, - - - - -

10. - un desprendimiento gaseoso superior o igual a 32 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>5</sub> en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 38 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>5</sub>; un desprendimiento gaseoso igual o superior a 750 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 820 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub>. - - - - -

15. 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: - - - - -

20. - 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, - - - - -

- 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. - - - - -

5. 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%. - - - -

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

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

- de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 8.2 para las levaduras secas. - - - - -

15. 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 clásica, apropiado para proporcionar unas levaduras secas estables en conservación y estables al secado. Estas levaduras puede, a continuación, ser secadas a aproximadamente 92% de materias secas o más con la ayuda de un procedimiento de secado particularmente cuidadoso. - - - - -

Preferentemente, se conducirá el cultivo de la le  
vadura de manera que se obtenga una levadura fresca con 28-  
35% de materias secas que tengan las características siguien  
tes: - - - - -

5. - cantidad de grumos inferior a 5% y, preferentemen-  
te, inferior a 1%, - - - - -
- descenso crioscópico del agua externa de la levadu  
ra inferior a 0,5°C, y, preferentemente, inferior  
a 0,3°C. [Se señala que, para medir el descenso  
10. crioscópico del agua externa de una levadura pren-  
sada con 30-35% de materias secas, se realiza una  
crema con 100 g de la levadura prensada y 30 g de  
agua perfectamente desmineralizada, se centriñuga  
esta crema y se mide el descenso crioscópico del  
15. 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 pro  
porcional a la cantidad de moléculas-gramo de sub  
stancias disueltas en el agua externa<sup>7</sup>. - - - - -
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 desean obtener unas levaduras que tengan unas ca  
racterísticas más particulares, por ejemplo la estabilidad  
25. 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 da-
- 10.
- 15.
- 20. dos a continuación no son más que indicativos: - -

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

$$- 2,3 \ll \frac{N}{P_{205}} \ll 3,8.$$

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 estas 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. bajo los nºs. R 30 y N.C.Y.C.877. - - - - -

15. Se aíslan 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. - - - - -

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

Las curvas de crecimiento del primero y segundo tests se realizan en unos matraces ópticos, matraces provis-

tos de un tubo calibrado que permite una lectura en el colorímetro sin extracción del medio. El medio de cultivo YEP es es tá 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 precultivo agitado del híbrido a ensayar en medio líquido al 1% de azúcar. - - - - -

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 le vadura 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
- 20. maltosa ..... 2 mg

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 colo

rimétrico con la antrona. - - - - -

5. 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. - - - - -
- 10.

15. Se determina, en el marco del primer test de screening, el coeficiente  $\mu$ : 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  $\mu_t$ . - - - - -

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

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

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

$$\mu \text{ en } 0,433 \% \text{ de ácido acético} < 0,4 \mu_t \quad \text{y un}$$
$$\mu \text{ en } 0,466 \% \text{ de ácido acético} < 0,25 \mu_t$$

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

- 5.  $\mu$  en 0,433 % de ácido acético  $> 0,6 \mu_t$  y un  $\mu$  en 0,466 % de ácido acético  $> 0,4 \mu_t$

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

- 10.  $\mu$  en 0,433 % de ácido acético  $> 0,55 \mu_t$  y un  $\mu$  en 0,466 % de ácido acético  $> 0,32 \mu_t$ .

- 15. 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. - - - - -
- 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. - - - - -

5. En el marco de la selección tal como se ha descri-  
to anteriormente, se consideran 10 híbridos de los 196 obte-  
nidos por cruce. - - - - -

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

- curva de crecimiento equivalente a los testigos en  
el primer test, - - - - -

10. - adaptación a la maltosa caracterizada por un consu-  
mo 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, - - - - -

15. - contenido en invertasa inferior a 35 unidades y,  
preferentemente, inferior a 30 unidades y, aún más  
preferentemente, inferior a 20 unidades en el cuar-  
to test, o/de preferencia un crecimiento en presen-  
cia de ácido acético caracterizado por un: - - -

20.  $\mu$  en 0,433 % de ácido acético  $> 0,55 \mu_t$  o/y un  
 $\mu$  en 0,466 % de ácido acético  $> 0,32 \mu_t$ .

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

5. 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. - - - - -

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

10. . 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 m<sup>3</sup>/hora y la inseminación se realiza por 300 mg de levadura obtenida por cultivo anaerobio en matraces, - - - - -
15. . 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, - - - - -
20. . 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 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 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 <sub>1</sub> 1 hora	Test A <sub>2</sub>	Test A <sub>3</sub>	Test A <sub>4</sub>
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 tests 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. - - - - -

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. - -

Se dan en la tabla II los resultados obtenidos para estos dos híbridos en fábrica después de cultivo de 100 m<sup>3</sup> que conducen a recoger aproximadamente 25 toneladas de levadura fresca, llevada de manera que se obtenga: - - - -

- 5. . un contenido de nitrógeno sobre materias secas de aproximadamente 8%,
- 10. . un contenido de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sobre materias secas de aproximadamente 2,3%,
- . un contenido de trealosa sobre materias secas de aproximadamente 13%,
- . un porcentaje de grumos del orden de 1%,
- 15. . 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). - - - - -

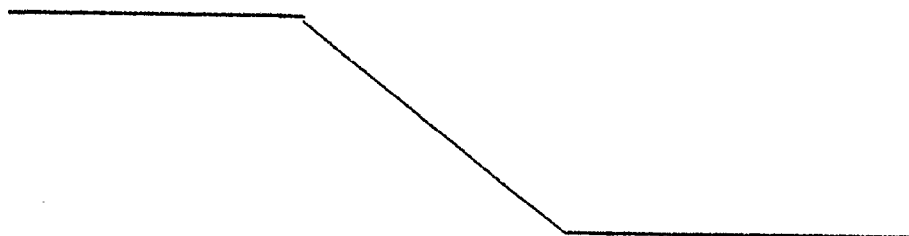


TABLA II

Cepa	LEVADURAS FRESCAS								
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	B <sub>1</sub>		B' <sub>3</sub>	
						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' <sub>1</sub>	A' <sub>2</sub>	A' <sub>3</sub>	A' <sub>4</sub>	A' <sub>5</sub>	B <sub>1</sub>		B' <sub>3</sub>	
						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. - - - - -

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

10. 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 es t<sup>er</sup>ilmente 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 ni trosoguanidina es adicionado con una concentración final de 200 a 400 microgramos/ml. - - - - -

20. 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 dilu<sup>ci</sup>ón 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%. - - - - -

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

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

Se conduce este trabajo hasta la obtención de: - - -

- 5 haploides mutantes de mating tipo a
- 10. - 5 haploides mutantes de mating tipo  $\alpha$

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: - - - - -

15. - 6 haploides salidos de las cepas lentas de mating tipo a,
- 4 haploides salidos de las cepas lentas de mating tipo  $\alpha$ .

20. 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. - - - - -

Gracias a estos test 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. -

TABLA IV

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

EJEMPLO 3

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

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

10. Se efectúan así 110 cruces que conducen a 21 hí-  
bridos considerados después de selección según el primer  
test, el cuarto test y el tercer test, los tres utilizados  
como en el ejemplo 1. - - - - -

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

15. Los resultados obtenidos con estos híbridos en en-  
sayos en fermentadores tipo WHITE de 3 litros están relacio-  
nados en la tabla V siguiente. Sus características taxonómi-  
cas están relacionadas en la tabla VI. Los 5 híbridos obteni-  
dos en el marco de estos ejemplos han sido todos identifica-  
dos como unos Saccharomyces Cerevisiae. - - - - -

20.

---

POOR  
QUALITY

TABLA V

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

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 tests que la N.C.Y.C. R 30, comprendiendo el test A<sub>4</sub> que corresponde a una pasta muy

5. 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. - - - - -

10.

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

- 15. - Ha 1 haploide de mating tipo a que ha recibido el nº N.C.Y.C. 881
- Ha 2 " " tipo a que ha recibido el nº N.C.Y.C. 882
- Ha 3 " " tipo α que ha recibido el nº N.C.Y.C. 883

- H $\alpha$  4 haploide de mating tipo  $\alpha$  que ha recibido el n $^{\circ}$  N.C.Y.C. 884
- H $\alpha$  5 " " tipo  $\alpha$  que ha recibido el n $^{\circ}$  N.C.Y.C. 885

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

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

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

Los dos primeros haploides Ha<sub>1</sub> (N.C.Y.C. n $^{\circ}$  881) y Ha<sub>2</sub> (N.C.Y.C. n $^{\circ}$  882) son particularmente destacables: - - -

- 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 cuan

do son conjugados con haploides salidos de levaduras lentas.

Los dos haploides  $H\alpha_3$  (N.C.Y.C. nº 883) y  $H\alpha_4$  (N.C.Y.C. nº 884) son ejemplos interesantes y de alto rendimiento de haploides salidos de levaduras rápidas no osmoterantes. -----

5.

El haploide  $M\alpha_5$  es un buen ejemplo de un haploide que tiene unas características de muy buena adaptación a las pastas azucaradas. -----

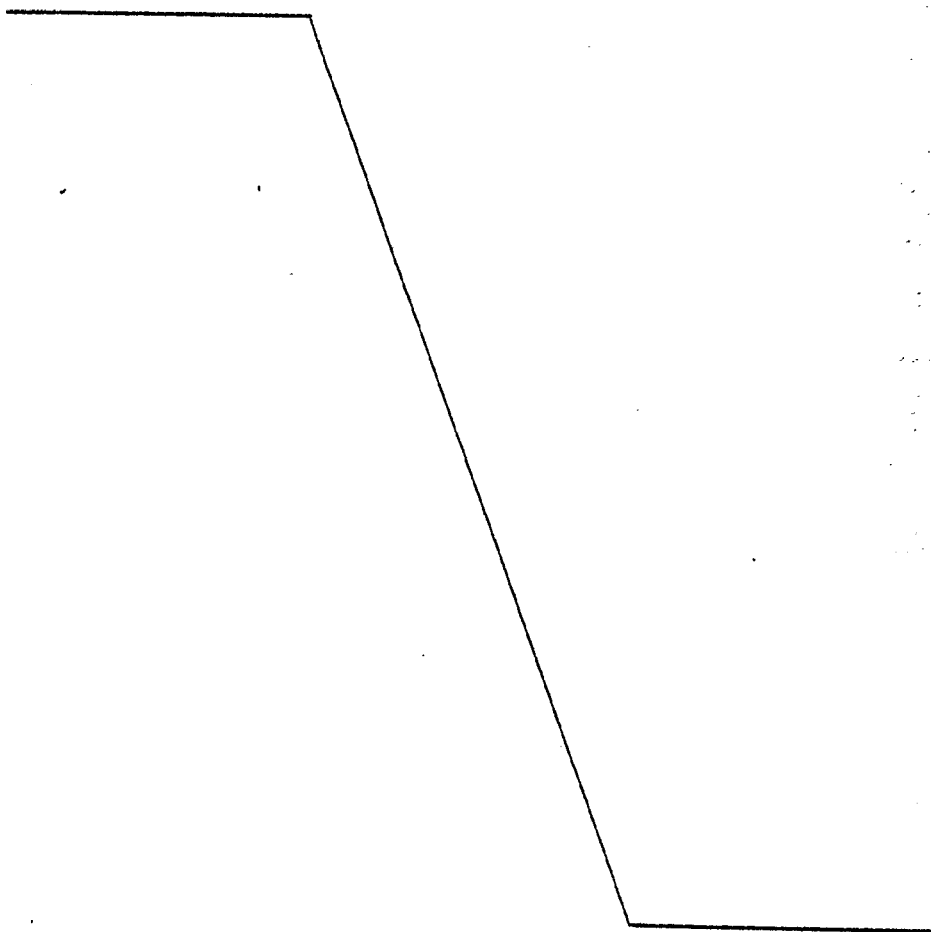


TABLA VI

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 o 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	+	latente	+	+	-	-	+	-
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) x	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	+	latente	latente	+	-	-	latente	-
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 (2,5-9)	2	+	+	+	+	-	-	+	débil
NCYC R30	Saccharomyces Cerevisiae	(1,5-8)x (2-7)	(1,5-8)x (2-6)	(2,9-8)x (2,5-7)	1 a 2	+	+	+	+	-	-	+	-

NOTAS: Las 9 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, - -

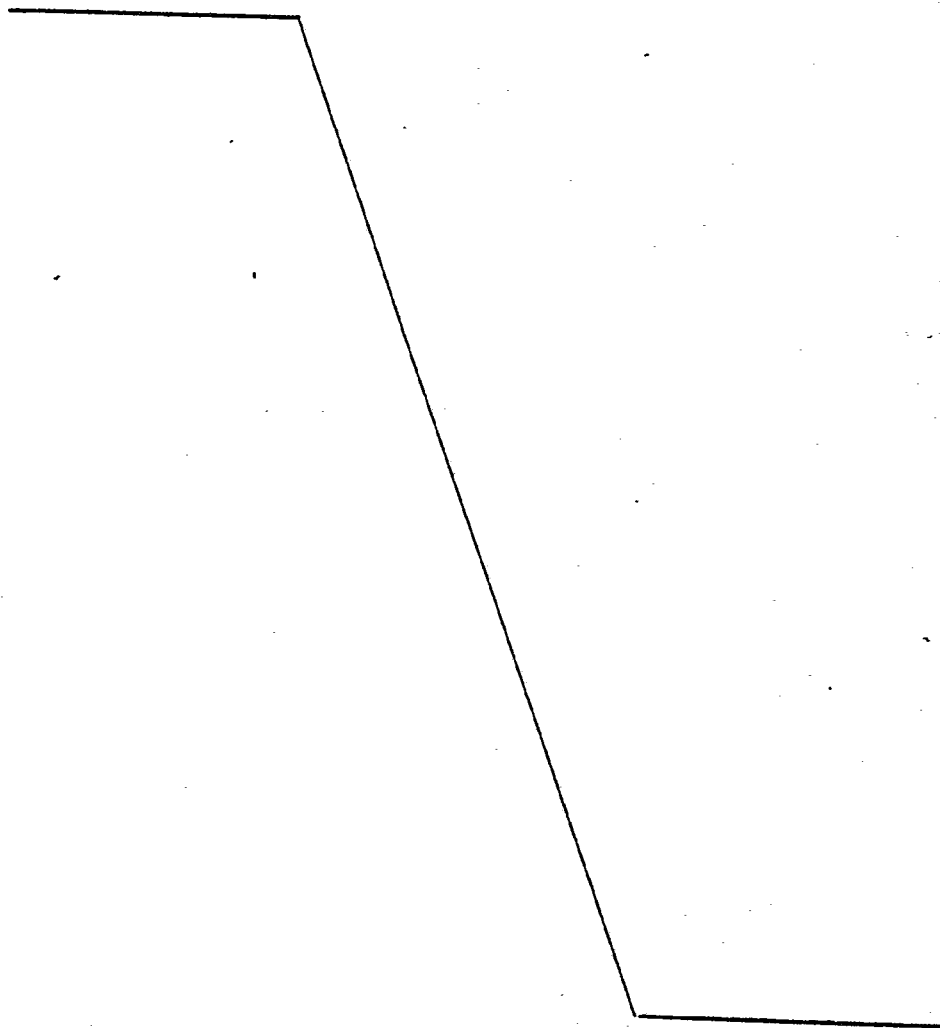
- por otra parte, de levaduras frescas y comprimidas obtenidas a partir de estas nuevas cepas y que constituyen unos productos industriales nuevos, - - - - -

20.

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. - - - - -

Desde luego y como resulta además de lo que antecede, 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.- Método de producción de levadura de panadería y similares, caracterizado por partir de una cepa que se selecciona por medio del primero y por lo menos otro test de screening elegidos en un conjunto de test de screening en que no se recurre a ninguna medición de desprendimiento gaseoso, 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 inseminado por una suspensión de células obtenidas a partir de esta cepa, - - - - -

15. - 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, - - - - -

20. - un tercer test que consiste en medir la adapta-ción 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 glu-cosa adicionada a este medio haya sido completamente consu-

---

mida, -----

- un cuarto test que consiste en dosificar el con  
tenido de invertasa de dicha cepa, -----

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

2.- Método según la reivindicación 1, caracteriza  
do porque para preparar levaduras de panadería y similares,  
frescas y estables en la conservación y al secado, se culti  
va la cepa seleccionada bajo condiciones tales que: ---

10. - la cantidad de grumos o yemas de esta levadura  
fresca es inferior a 5% y, preferentemente, in  
ferior a 1%, -----

- su contenido en proteínas corresponde al óptimo  
de la cepa seleccionada, -----

15. - su composición corresponde a las desigualdades  
siguientes: -----

$$\cdot \frac{\text{trealosa}}{\text{materias secas}} \geq 12\%$$

$$\cdot 2,3 \leq \frac{N}{P_{205}} \leq 3,8$$

- siendo el descenso crioscópico del agua externa de la levadura inferior a 0,5°C. - - - - -

5. 3.- Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque, para fabricar una levadura seca y activa, a la levadura preparada se le adiciona un emulsionante del grupo que comprende el monoestearato de sorbitol y el éster de poliglicerol y porque se seca la levadura así tratada bajo condiciones cuidadosas que son las de las técnicas de secado en fluidización, de secado neumático o la combinación de estos dos tipos de secado. - - - - -

10. 4.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque la cepa seleccionada permite obtener una levadura fresca, de alto rendimiento en pastas azucaradas y que da: -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 112 y, preferentemente, a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> en 2 horas, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 135 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> y a 1.700 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub>, - - - - -

20. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 53 preferentemente a 55 ml de CO<sub>2</sub> en 1 hora en el test A<sub>2</sub> y, más preferentemente, aún, igual o superior a 60 ml en este test en 1 hora, - - - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 50 ml de CO<sub>2</sub> en 1 hora en el test A<sub>3</sub> y, preferentemente, igual o superior a 55 ml en el test A<sub>3</sub> en 1 hora, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 25 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>4</sub> y, preferentemente, igual o superior a 30 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>4</sub> en 1 hora y, más preferentemente aún, igual o superior a 35 ml de CO<sub>2</sub>. - - - - -

10. 5.- Método según la reivindicación 3, caracterizado porque la cepa seleccionada permite obtener unas levaduras secas de alto rendimiento en pastas azucaradas y que dan: - - - - -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 98, preferentemente a 100 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> en 2 horas, superior o igual a 1.350 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> y a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas, - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 46, preferentemente a 48 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>2</sub> en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 52 ml en el test A'<sub>2</sub>, -

20. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 44 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>3</sub> y, preferentemente, igual o superior a 47 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>3</sub>, - - - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 21 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>4</sub> y, preferentemente, igual o superior a 26 ml de CO<sub>2</sub>. - - - - -

5. 6.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque la capa seleccionada permite obtener una levadura fresca de alto rendimiento en pastas ácidas y que da: - - -

10. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> en 2 horas e igual o superior a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 135 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> y a 1.700 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub>, - - - - -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 40 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>5</sub> en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 45 ml de CO<sub>2</sub> en este test A<sub>5</sub> en 1 hora, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 900 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 1000 ml de CO<sub>2</sub> en este test B'<sub>3</sub> en 3 horas. - - - -

20. 7.- Método según la reivindicación 3, caracterizados porque la cepa seleccionada permite obtener unas levaduras secas de alto rendimiento en pastas ácidas y que dan: -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 100 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> en 2 horas, superior a 1.350 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o

superior a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> y a 1.500 ml en el test B<sub>1</sub> en 3 horas, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso superior o igual a 32 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>5</sub> en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 38 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>5</sub>; un desprendimiento gaseoso igual o superior a 750 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 820 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub>. - - - - -

10. 8.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque la cepa seleccionada permite obtener levaduras frescas que presentan simultáneamente las propiedades siguientes: - - - - -

15. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 112 y, preferentemente, a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> en 2 horas, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas, y, preferentemente, igual o superior a 135 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>1</sub> y a 1.700 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub>, - - - - -

20. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 53 preferentemente a 55 ml de CO<sub>2</sub> en 1 hora en el test A<sub>2</sub> y, más preferentemente aún, igual o superior a 60 ml en este test en 1 hora, - - - - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a

50 ml de CO<sub>2</sub> en 1 hora en el test A<sub>3</sub> y, preferentemente, igual o superior a 55 ml en el test A<sub>3</sub> en 1 hora, - - - - -

5. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 25 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>4</sub> y, preferentemente, igual o superior a 30 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>4</sub> en 1 hora y, más preferentemente aún, igual o superior a 35 ml de CO<sub>2</sub>, - - - - -

10. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 40 ml de CO<sub>2</sub> en el test A<sub>5</sub> en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 45 ml de CO<sub>2</sub> en este test A<sub>5</sub> en 1 hora, un desprendimiento gaseoso igual o superior a 900 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 1000 ml de CO<sub>2</sub> en este test B'<sub>3</sub> en 3 horas. - - - - -

15. 9.- Método según la reivindicación 3, caracterizado porque la cepa seleccionada permite obtener unas levaduras secas que presentan simultáneamente las propiedades siguientes: - - - - -

20. - un desprendimiento gaseoso igual o superior a 98, preferentemente a 100 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> en 2 horas superior o igual a 1.350 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 115 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>1</sub> y a 1.500 ml de CO<sub>2</sub> en el test B<sub>1</sub> en 3 horas. - -

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a

46, preferentemente a 48 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>2</sub> en 1 hora y, preferentemente, igual o superior a 52 ml en el test A'<sub>2</sub>,

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 44 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>3</sub> y, preferentemente, igual o superior a 47 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>3</sub>, - - - - -

5.

- un desprendimiento gaseoso igual o superior a 21 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>4</sub> y, preferentemente, igual o superior a 26 ml de CO<sub>2</sub>, - - - - -

10.

- un desprendimiento gaseoso superior o igual a 32 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>5</sub> en 1 hora, y preferentemente, igual o superior a 38 ml de CO<sub>2</sub> en el test A'<sub>5</sub>; un desprendimiento gaseoso igual o superior a 750 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub> en 3 horas y, preferentemente, igual o superior a 820 ml de CO<sub>2</sub> en el test B'<sub>3</sub>. - - - - -

15.

10.- Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la cepa seleccionada utilizada es la cepa depositada en la National Collection of Yeast Culture (NCYC) bajo el número NCYC 847. - - - - -

20.

11.- Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la cepa seleccionada utilizada es la cepa depositada en la National Collection of Yeast Cultures (NCYC) bajo el número NCYC 848. - - - - -

12.- Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la cepa seleccionada utilizada es la cepa depositada en la National Collection of Yeast Cultures (NCYC) bajo el número NCYC 878. - - - - -

5. 13.- Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la cepa seleccionada utilizada es la cepa depositada en la National Collection of Yeast Cultures (NCYC) bajo el número NCYC 879. - - - - -

10. 14.- Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la cepa seleccionada utilizada es la cepa depositada en la National Collection of Yeast Cultures (NCYC) bajo el número NCYC 880. - - - - -

15.- "METODO DE PRODUCCION DE LEVADURA DE PANADERIA Y SIMILARES". - - - - -

15. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de cincuenta y ocho hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID 20 SET. 1978

P. A. M. CURELL SUÑOL