



TÍTULO DE PATENTE No. 380561

Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Domicilio: Lascuráin de Retana No. 5, Colonia Centro, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO

Denominación: LEVADURA CON ALTO CONTENIDO DE SELENIO ORGÁNICO, PRINCIPALMENTE COMO SELENIO METIONINA (SeMet).

Clasificación: **CIP:** C12N1/16; A23L33/14; A23L33/29; C12P1/02; C12P13/12; C12R1/865
CPC: C12N1/16; A23L33/14; A23L33/29; C12P1/02; C12P13/12; C12R1/865; Y10S435/942

Inventor(es): GLORIA ANGÉLICA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ; JUAN CARLOS TORRES GUZMÁN; ISRAEL ENRIQUE PADILLA GUERRERO; VÍCTOR MANUEL GARCÍA VERA; NARU IDALIA VARGAS MAYA; MARÍA DEL ROSARIO RAMÍREZ ZÚÑIGA; ADRIANA GARCÍA TAPIA

SOLICITUD

Número:
MX/a/2016/016813

Fecha de Presentación:
16 de Diciembre de 2016

Hora:
13:30

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 16 de diciembre de 2036

Fecha de Expedición: 26 de febrero de 2021

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autenticidad, se podrá comprobar en www.gob.mx/imp.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|0000100000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION
TRIBUTARIA|56||MX/2021/31282|MX/a/2016/016813|Título de patente normal|1027|RGZ|Pág(s)
1|k0tJYX71GEMGTu5MSXR|c7fmE0=

Sello Digital:
rdfGV6EEaYPdfS0tMjrt+ugCea0QZ3PbCV7hbB9e0cc6FoY9BXYIzkQtRKSU9BlxZ3Yy1CTAwm4i7aT2U741cpwHnt
ggMpEs6vrkcX2zxsG6Brp0Zmf8E7vbu3kymewyJpD1xYcsjJyW96SMYoJ2NqfZlIxUNBfoQOEVLr0nn1ODTAIxkGY
3w54RUNIUNpXcOgUQnG65HNu9z7VJqwwQ78vQbUKw/0QovMUoz3La+9A7+pMevOejgaph8wNE/TqgP+PTZVPWuaB9B
UtTYYT43orZtjOsd4jvXhqQ+Mmlv2ojIOl3ZsYtFxcR3Zz14f4ITIBU/pES6cwiRbVBrqkA==



MX/2021/31282

LEVADURA CON ALTO CONTENIDO DE SELENIO ORGÁNICO,
PRINCIPALMENTE COMO SELENIO-METIONINA (SeMet).

OBJETO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención está relacionada con una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* capaz de acumular Selenio orgánico, principalmente en forma de Selenio-metionina.

ANTECEDENTES

- 10 El Selenio es un micronutriente esencial en la dieta de muchas formas de vida, incluyendo los seres humanos y otros mamíferos. Se han descrito algunos de sus beneficios en la salud. Por ejemplo, se le ha reconocido como uno de los agentes quimiopreventivos del cáncer. Es importante en la reducción de la expresión viral, en el retraso de la progresión del SIDA en pacientes infectados por el virus; en la prevención de enfermedades del corazón y otros
- 15 trastornos cardiovasculares y musculares; adicionalmente puede ser importante en el desarrollo, en la función inmune, en la reproducción masculina, y en el retraso del proceso de envejecimiento (Hatfield y Gladyshev, 2002). Todos estos beneficios del Selenio, oligoelemento que determina el funcionamiento normal del organismo, es debido principalmente a sus propiedades antioxidantes, protegiendo de la acción de radicales libres
- 20 y de factores cancerígenos a las células. El Selenio está implicado en el metabolismo del peróxido de hidrogeno y de lípidos hidroperóxidos, constituyendo parte integral de algunas enzimas entre ellas, la glutatión peroxidasa, (GPx), la yodotironina deiodinasa, y tioredoxina reductasa (TrxR); que protegen a las células del efecto nocivo de radicales libres formados en los procesos de oxidación, siendo importantes para la defensa antioxidante, mantenimiento
- 25 de la homeostasis redox, y la señalización redox (Kieliszek y Blazejak, 2013, Legrain *et al* 2014).
- Legrain *et al* (2014) han descrito que durante el envejecimiento los niveles de Selenio declinan, y su deficiencia se ha asociado con un marcado aumento de la mortalidad en personas mayores de 60 años de edad. A nivel celular, en estudios realizados en células de
- 30 fibroblasto humano, se ha visto que los niveles de Selenio regulan la entrada a senescencia y

modifican los marcadores celulares característicos de las células senescentes, modulando la expresión de Se-proteínas transcripcional y traduccionalmente. Por ejemplo, en cultivos de la cepa WI-38 la suplementación de Selenio aumenta el número de duplicaciones de la población celular, y su deficiencia perjudica la capacidad proliferativa (Legrain *et al*, 2014).

5 Se ha observado que varias Se-proteínas implicadas en defensa antioxidante se afectan específicamente en respuesta a la senescencia celular (Legrain *et al*, 2014). Los cambios en los niveles de Selenio en proteínas como glutatión peroxidasa (GPX4), Selenioproteína del retículo endoplásmico (SELS), Selenioproteína citoplásmica (SELP), tioredoxina reductasas (TR1 y TR2) pueden ser considerados como nuevos biomarcadores de la senescencia

10 replicativa y demuestran una interacción entre la concentración de Selenio, expresión de Selenioproteínas y la senescencia celular en los fibroblastos humanos (Legrain *et al* 2014).

Suplementación de Selenio en la Dieta

Debido a sus efectos benéficos, la Organización Mundial de la Salud recomienda una dosis

15 diaria de Selenio de 30-40 μg en adultos y también hace hincapié que una dosis de Selenio de hasta 400 μg al día es inofensivo. En animales generalmente el Selenio se mezcla junto con el alimento. En ganado vacuno, equino y aves, se mezclan 100 g de levadura selenizada/ton de alimento y en el caso de los cerdos se adiciona 200 g/ton de alimento (OMS, 2003, WHO/SDE/WSH/03.04/13).

20 Aunque el Selenio tiene efectos benéficos en general en la salud del hombre y de muchas especies, debe tenerse cuidado con la suplementación de este metal, ya que cuando se encuentra a mayor concentración de la necesaria, es tóxico para los seres vivos. Por ejemplo, se ha visto que en individuos que reciben dosis de Selenio mayores a las necesarias se incrementa el riesgo de sufrir Diabetes tipo 2 (Ogawa Wong *et al*, 2016). Por tal motivo es

25 importante contar con productos de suplementación de Selenio que proporcionen un alto grado de seguridad y balancear las dietas, proporcionando dosis adecuadas de Selenio para evitar su deficiencia, pero sin descuidar el riesgo de generar toxicidad, lo que significa que es importante contar con una fuente de Selenio de calidad en la cual no haya variaciones significativas en la cantidad de este oligoelemento de un lote a otro.

Por otra parte, se sabe que los efectos benéficos del Selenio se dan tanto si se usa la forma inorgánica del Selenio (Selenito de Sodio) (Birth *et al*, 1982) y/o la forma orgánica Selenio cisteína (SeCis) o Selenio metionina (SeMet) principalmente (Rayman, 2004). En el caso del Selenio inorgánico en la alimentación de rumiantes, el uso y manipulación del Selenito de Sodio se ven limitados por el riesgo de toxicidad cuando no se balancea adecuadamente, o no se mezcla perfectamente en las sales o el alimento. El tratamiento de corderos con Selenito de Sodio y Selenio metionina no mostró diferencias en cuanto a la absorción y digestibilidad del Selenio (Cruz Monterrosa *et al*, 2011). Sin embargo, en cerdos los datos indican que, mientras el Selenio orgánico tiene una mejor biodisponibilidad en la leche de cerdas adultas, en cambio el Selenito de Sodio permite una mayor actividad biológica de la Glutatión peroxidasa en el suero (Mahan, 2000). Jing *et al* (2015) describieron que, en gallinas ponedoras la suplementación de Selenio en forma de SeMet contra Selenito de Sodio y contra Selenio-levadura (SY), en la actividad antioxidante y el nivel de Selenio mostró que con las fuentes de Selenio orgánicos hay mayor capacidad de aumentar la actividad antioxidante y la deposición de Selenio en albúmina de huevo, de la pierna, y los músculos de la pechuga, en contraste con la forma inorgánica (Selenito de Sodio). Entre la Selenio metionina y la Selenio-levadura hubo diferencia de enriquecimiento significativa siendo mejor la Selenio metionina en la acumulación de Selenio en la albúmina y el músculo. De lo que se puede concluir que es importante disponer tanto de fuentes de Selenio inorgánicas como orgánicas para la suplementación adecuada de este oligoelemento.

Fuentes de Selenio Inorgánico y Orgánico.

En el caso de fuentes de Selenio inorgánicas, tratando de mejorar la biodisponibilidad de éste, Sonkusre *et al* (2014) han descrito el uso de bacterias como *Bacillus licheniformis* para producir nanopartículas compuestas de Selenio inorgánico y cubiertas con algunos grupos funcionales para darle estabilidad. Estas nanopartículas de Selenio de carga neutra, no aglomeradas, conservan su efecto benéfico en la inhibición de la proliferación, así como inducir la necrosis independiente de caspasa en células de adenocarcinoma de próstata humano sin causar toxicidad significativa en células mononucleares de sangre periférica.

En el caso de la producción de Selenio orgánico hay varias formas alternativas para obtenerlo como suplemento; en levaduras, en bacterias y biomasa vegetal, y por síntesis química.

En las células, dado que similitudes físicas y químicas del Selenio y el azufre les confieren propiedades parecidas, las enzimas implicadas en el metabolismo de sulfato y en la vía trans-sulfuración no discriminan entre el selenio y el azufre. Se ha demostrado que pequeñas cantidades de Selenio-compuestos orgánicos en plantas, levaduras, bacterias o animales son análogos de compuestos de azufre (Birringer *et al.*, 2002). El Selenio al igual que el azufre es incorporado principalmente a dos aminoácidos azufrados: la cisteína y la metionina. La metionina que contiene Selenio, denominada Selenio metionina (SeMet), representa el ±85 % del selenio orgánico en la levadura y el restante lo forman diferentes Selenio-compuestos (Fan *et al.*, 2003).

En levaduras la tolerancia al Selenio varía ampliamente: el crecimiento de algunas levaduras puede ser inhibida por una concentración de Selenio tan bajo como 10^{-4} M, mientras que otras pueden crecer en presencia de 10^{-1} M de Selenio. En general, las levaduras Ascomicetas son más tolerantes al Selenio que las levaduras Basidiomicetas. Entre las Ascomicetas, las más tolerantes al Selenio son *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida maltosa*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Yarrowia lipolytica*. La tolerancia al Selenio de levaduras se ve influenciada por la composición del medio de crecimiento, en particular, de la presencia de sulfato, aminoácidos que contienen azufre, y glutamina (Golubev y Golubev, 2002; Mapelli *et al.*, 2011). El metabolismo del Selenio en *Saccharomyces cerevisiae* es altamente influenciado por la disponibilidad de sulfato, regulando la cantidad de Selenio incorporada y la especiación intracelular de Selenio. En particular la Selenio metionina, típicamente el principal producto de Selenio orgánico en la levadura, es el principal metabolito únicamente en condiciones de baja disponibilidad de sulfato (Mapelli *et al.*, 2011).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha acompañado a la civilización humana desde antaño en la producción de pan, bebidas fermentadas, etc., por lo mismo es ampliamente utilizada en la industria, además de su facilidad de crecimiento es un *organismo reconocido generalmente como seguro* (GRAS, Generally Recognized As Safe) y por ende ampliamente aceptado por el consumidor, además ha sido objeto de estudio, observando que puede ser una fuente eficaz, segura y natural de Selenio orgánico para utilizarse en la dieta en forma de

Selenio metionina principalmente. La capacidad de la levadura de acumular Selenio orgánico como Selenio metionina (SeMet) y Selenio cisteina (SeCis) principalmente, puede ser utilizada para disponer de productos enriquecidos en microelementos esenciales para el desarrollo apropiado de diferentes organismos (Kieliszek y Blazejak, 2013). En el

5 **documento de patente CP102559523 (A) 2012-07-11** se ha descrito un método para obtener un hidrolizado de levadura enriquecido en Selenio orgánico a bajo costo, reportando un promedio de 1,000 a 4,000 mg de Selenio por Kg de levadura, del cual, el 92-99% corresponde a Selenio orgánico. Para ello crecen la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* GABC103 en presencia de Selenio, las células se lavan y se lisan por calor, las paredes

10 celulares son eliminadas por centrifugación y el extracto libre de células conteniendo el Selenio orgánico es deshidratado. En el **documento de Patente CN104711202 (A) — 2015-06-17**, se ha descrito un método de producción con alta tasa de conversión de Selenio orgánico por la levadura, el cual consiste en poner los granos de trigo en contacto con el Selenito de sodio, tritularlo y crecer en él a la levadura para la conversión a Selenio

15 metionina. De acuerdo con la invención, puesto que se emplea una levadura rica en Selenio para la conversión secundaria, el Selenio inorgánico residual en la malta está totalmente convertida en Selenio orgánico, siendo más seguro y tiene un mejor efecto. Sin embargo, el uso de grano de trigo encarece el proceso. Por otra parte, en el documento de patente **CN103932198 (A) — 2014-07-23** se ha descrito el uso de levadura de cerveza para tener un

20 producto enriquecido en Selenio orgánico y glutatión, utilizando como medio de cultivo los residuos de la industria de la cerveza, proceso en el cual convierte el Selenio inorgánico en Selenio orgánico y se incrementa la síntesis del glutatión. En esta invención se producen tabletas de levadura enriquecida en Selenio orgánico y glutatión. Adicionalmente a la Selenio metionina, el glutatión también permite mejorar el estado redox de la célula, por ejemplo,

25 gracias a su capacidad de ser oxidado y reducido en el ciclo del ascorbato-glutatión.

Otro método para tener Selenio orgánico con alta eficiencia mediante el empleo de levaduras, es el proceso descrito en el documento de patente **CN103756922 (A) — 2014-04-3**, en el cual la fuente inorgánica de Selenio es Nano-Selenio. Otra invención para obtener levadura enriquecida con Selenio orgánico y alta cantidad de biomasa, es el documento de patente

30 **CN103667086 (A) — 2014-03-26** en el cual mediante adaptación de *Saccharomyces*

cervisiae subespecie *boulardii* YBN-2 en un medio con alta concentración de Selenio, se logra obtener selenio-levadura con un contenido de Selenio entre 2800-3200 µg/g de levadura.

- 5 Las bacterias ácido-lácticas pueden acumular alta concentración de Selenio y pueden ser utilizadas para la producción de Selenio orgánico. Así en los **documentos de patente CN102860408 (A) — 2013-01-09** y **CN103305434 (A) — 2013-09-18** se describe el uso de una mezcla de bacterias; *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, o bien la mezcla de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las bacterias *Rhodopseudomonas palustris*
- 10 y *Lactobacillus plantarum*, para ser utilizados como probióticos además de fuente de Selenio orgánico y glutatión como suplemento en forrajes en ganado, agricultura y en alimentos. También se han descrito el uso de otros géneros de levadura aparte de *Saccharomyces*, por ejemplo, en los documentos de patente **CN101864369 (A) — 2010-10-20**, **KR100581343 (B1) — 2006-05-17**, y **CN101792720 (A) — 2010-08-04** se describen cepas de la levadura
- 15 *Candida utilis* y *Candida tropicalis*, con elevada tolerancia, enriquecimiento y conversión del Selenito de Sodio a Selenio orgánico. Sin embargo, a pesar de estas características deseables cabe mencionar que esta levadura al igual que otras especies de *Candida* son consideradas patógenos emergentes (García Martos *et al*, 2001), por lo que las levaduras del género *Candida* no son candidatos ideales para ser utilizados a nivel industrial para la
- 20 producción de Selenio orgánico, debido a que, al ser patógenos de humano, no son *organismos generalmente reconocidos como seguros* (GRAS).

También mediante fermentación sólida de la levadura empleando como sustrato hierbas medicinales mezcladas con Selenio inorgánico y otros componentes se ha obtenido un alto

25 contenido de Selenio (ver documento de patente **CN101139554 (A) — 2008-03-12**).

La síntesis química de la SeMet fue descrita desde 1975 en el documento de patente **C07c163/00**. La invención se refiere a una síntesis química de la sustancia radiactiva ⁷⁵Selenio metionina; (CH₃ Se-CH₂-CH- (NH₂) -COOH) a partir de Selenio radioactivo (⁷⁵Se),

30 el cual se usa como trazador para los tumores, especialmente para exploración del páncreas.

Posteriormente se desarrolló tecnología para sintetizar químicamente Selenio metionina con un alto rendimiento y minimizado la presencia de compuestos secundarios tóxicos (Koch y Buchardt, 1993). Incluso se ha podido sintetizar Selenio metionina a partir de metionina mediante mutación atómica química (ver Iwaoka *et al*, 2008). Y se ha visto que la Selenio metionina producida químicamente también es muy eficiente como suplemento (Cruz-Monterrosa, *et al* 2011). Sin embargo, a pesar de que es posible sintetizar químicamente la Selenio metionina, es importante señalar que el uso de levadura selenizada además de suplementar las necesidades de Selenio orgánico e inorgánico, la ingestión de la levadura *per se* tiene beneficios adicionales, por ejemplo en el ganado vacuno: en el rumen, incrementa el pH y la concentración de ácidos grasos volátiles, disminuye la concentración de ácido láctico y no afecta la relación acetato-propionato; aumenta la digestibilidad de la materia orgánica consumida, e incrementa la captación de materia seca. En la producción de leche incrementa el rendimiento y su contenido de grasa, pero no afecta el contenido de proteína; mejora la fermentación en el rumen, entre otros beneficios. Estas ventajas adicionales no las tiene el uso de la Selenio metionina proveniente de síntesis química (Desnoyers *et al* 2009). También en humanos y en el ganado vacuno el consumo de levadura en la dieta estimula la respuesta inmune gracias a la presencia de glucanas en la pared celular de éstas (Williams *et al* 2016).

Por lo que es importante disponer de una cepa de levadura que contenga elevados niveles de Selenio orgánico, principalmente Selenio metionina, y que estos niveles de acumulación sean constantes, para facilitar el control de la dosis de Selenio metionina que pudiera administrarse como suplemento alimenticio.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Considerando la importancia que tiene el desarrollo de cepas generadas mediante evolución dirigida, sin manipulación genética, para ser utilizadas como suplemento alimenticio de Selenio orgánico, principalmente como Selenio metionina; mediante selección de los cambios que de forma natural han ocurrido en cepas silvestres normalmente utilizadas como

30

suplemento alimenticio para ganado, se seleccionó una cepa con mejores cualidades en cuanto a la acumulación de Selenio orgánico, principalmente Selenio metionina.

La cepa de la presente invención corresponde al género y especie *Saccharomyces cerevisiae* y ha sido depositada en la colección española de Cultivos Tipo (CECT): cepa
5 LABGENMOLH04Se con número de depósito de patente CECT13147 atribuido el 14 de junio de 2016 por la Autoridad Internacional del Depósito. Esta cepa fue obtenida mediante evolución dirigida a partir de una cepa silvestre nativa, propia de las fermentaciones para la producción de levaduras utilizadas como suplemento alimenticio para ganado, con la habilidad de crecer en presencia de alta concentración de Selenito de Sodio, siendo capaz de
10 acumular altas cantidades de Selenio metionina y presentar un buen crecimiento de biomasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la secuencia de DNA de la región ITS de la cepa LABGENMOLH04Se (LGMH04Se). Esta secuencia fue comparada contra la secuencia de la región ITS de la cepa
15 de referencia S288C en las bases de datos (<http://www.yeastgenome.org/download-data/sequence>). Las bases marcadas con * señalan las diferencias entre LABGENMOLH04Se y la cepa S288C. Para ello, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando DNA genómico de la cepa LABGENMOLH04Se, y los oligos TS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) y TS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)
20 descritos por Esteve-Zarzoso *et al* (1999), se amplificaron las secuencias ITS: ITS1 e ITS2 que son regiones no codificantes variables y el gen 5.8S del rRNA que es una región codificante y variable facilitando la discriminación entre distintas especies de levaduras. Estos fragmentos de 848 pb fueron secuenciados y comparados en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostrando una identidad de 99 a 100 % con los ITS
25 reportados de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* como S288C, MUCL51208, UOA/HCPF591, entre otras. El alineamiento entre todas estas secuencias, utilizando el programa DNASTAR Lasergene 14 ClustalW se observó que tienen entre sí 99.9 % de identidad y una divergencia de 0.1 %. Por tanto, el género y especie de la cepa LABGENMOLH04Se es *Saccharomyces cerevisiae*.

- La **Figura 2** muestra el porcentaje de Identidad y Divergencia entre la cepa LABGENMOLH04Se (LGMH04Se) y la cepa de referencia S288C obtenido al alinear estas secuencias y compararlas utilizando el programa DNASTar Lasergene 14 Clustal W. Este análisis de identidad y divergencia de la región ITS muestra que la identidad entre la cepa de referencia S288C y LABGENMOLH04Se es de 99.9 % y la divergencia es de 0.1%, por tanto, LABGENMOLH04Se corresponde sin lugar a dudas a la levadura generalmente reconocida como segura para la salud *Saccharomyces cerevisiae*.
- 10 La **Figura 3** muestra la biomasa producida por la cepa LABGENMOLH04Se (LGMH04Se) en comparación con la cepa parental Stock2. Este resultado es relevante, ya que era importante demostrar que la adquisición de la nueva característica de acumular altas concentraciones de Selenio, no afecta otras funciones que dañen el crecimiento celular. Ya que si así fuera, a nivel industrial se mermaría fuertemente la producción de Selenio orgánico al verse disminuida la capacidad de proliferación, es decir, menos células es igual a menos Selenio orgánico y no sería redituable aun cuando acumulara mucho Selenio orgánico en comparación con la cepa parental. Lo ideal es tener reunidas las dos características en la misma cepa; buen crecimiento y alta capacidad de acumular Selenio. Para ello, el aislado Stock2 y la cepa LGMH04Se fueron crecidos en medio rico YPD durante 36-42 h, colectando la biomasa por centrifugación y se llevó a peso constante deshidratando a 50 °C durante 36 h - 48 h, registrando el peso obtenido en mg. Los resultados mostrados indican que la cepa LABGENMOL04Se crece igual que la cepa parental Stock2. Por lo que podemos decir que LABGENMOLH04Se es una cepa competitiva en su capacidad de crecer y generar biomasa.
- 25 La **Figura 4** muestra el crecimiento de la cepa parental (Stock2) y de la cepa LABGENMOLH04Se (LGMH04Se) en medio mínimo suplementado con 10 mg de Selenito de Sodio /L de medio, en cultivos en matraces Erlenmeyer observando que tienen una cinética de crecimiento muy similar en esta condición de estrés. Sin embargo, los resultados de la Tabla 1 indican que la cepa LABGENMOLH04Se, es la mejor acumuladora de Se orgánico, por tanto, el rendimiento de producción de Se orgánico es mejor en esta cepa,
- 30

LABGENMOLH04Se, que en la cepa parental e incluso que el descrito para cepas comerciales consideradas como muy buenas como es el caso de la cepa Excell™. Por tanto, el empleo de LABGENMOLH04Se para producir Selenio orgánico a nivel industrial o semi industrial permitiría producir Selenio orgánico a menor costo. El Selenio orgánico es muy importante en la dieta de los animales y de los seres vivos en general, como suplemento alimenticio, ya que mejora la salud y la capacidad reproductora y previene enfermedades.

La **Figura 5** muestra el crecimiento de la cepa LABGENMOLH04Se (LGMH04Se) y de la cepa parental Stock2 en medio mínimo suplementado con 10 mg de Selenito de Sodio/L de medio, en cultivo tipo Batch en un biorreactor Applikon Biotechnology MY-CONTROL con agitación mecánica y en condiciones controladas de temperatura. En la figura 5 se aprecia que en condiciones que simulan las condiciones que se usarían a nivel industrial y semi-industrial, la cepa LABGENMOLH04Se crece de manera similar a la parental, y acumula más Selenio orgánico en forma de Selenio metionina en comparación con la cepa parental (ver Tabla 1).

La **Figura 6** muestra el esquema general del procedimiento que se sigue para cuantificar el Selenio orgánico en forma de SeMet y el selenio inorgánico, como SeVI, en levadura hidrolizada mediante el acoplamiento HPLC-HG-MP-AES descrito por Yañez-Barrientos *et al.*, (2016). La levadura es hidrolizada con ácido metasulfónico, en seguida la separación cromatográfica se hace en una fase móvil conteniendo ácido heptafluorobutírico y metanol. El efluente de la columna es mezclado con persulfato de potasio alcalino y calentado en un baño de agua a 60 °C. Enseguida se añade Borohidruro de sodio alcalino para la conversión del Se(VI) a Se (IV) en el sistema de introducción multimodo MP-AES donde se realiza la cuantificación del Selenio por espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas alimentada con Nitrógeno. La gran ventaja de este procedimiento son los límites de detección de 59 ng/mL para el Se(IV) y 0.59 µg para el Selenio metionina, permitiendo detectar diferencias entre cultivos satisfaciendo los requerimientos de sensibilidad y poder de detección.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la cual es un *organismo generalmente reconocido como seguro* (GRAS), utilizada para producir levadura selenizada. El crecimiento de la levadura se realiza en presencia de Selenito de sodio a una concentración

5 de 10-100 mg/L el cual es transformado por la levadura en Selenio orgánico, principalmente como Selenio metionina, obteniendo de este modo una levadura con alto contenido de Selenio orgánico, es decir, biomasa acumuladora de Selenio orgánico, y más específicamente como Selenio metionina.

Las cepas normalmente usadas como aditivo alimenticio, suelen ser cepas panaderas, o en el

10 mejor de los casos cepas cerveceras, raramente se utilizan cepas especializadas o adaptadas a desarrollarse en ambientes extremos, como puede ser la presencia de Selenito de sodio en el medio de cultivo; presentando bajo rendimiento en la producción de Selenio orgánico, ya sea por un bajo rendimiento en la producción de Selenio orgánico y/o bajo rendimiento de la biomasa. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* **LABGENMOLH04Se** (LGMH04Se)

15 obtenida mediante evolución dirigida empleando concentraciones crecientes de Selenito de sodio, está adaptada a crecer en altas concentraciones de este compuesto sin afectarse su crecimiento y acumulando elevadas cantidades de Selenio orgánico, principalmente Selenio metionina como puede verse en la Tabla 1. En esta Tabla 1 podemos ver que el nivel de acumulación de Selenio orgánico en esta cepa es mayor que observado en la cepa parental

20 crecida bajo las mismas condiciones.

Tabla 1. Determinación de SeMet y Se(IV) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por el procedimiento de especiación HPLC-HG-MP-AES					
Cepa	Selenio Metionina		Selenio inorgánico (SeIV)		Selenio Metionina + Se inorgánico en el hidrolizado % de Se
	Media \pm DS $\mu\text{g Se/g}$	% en la biomasa	Media \pm DS $\mu\text{g Se/g}$	% en la biomasa	
LGMH04Se	1275 \pm 31	81.5	129 \pm 13	8.2	94.8
Stock2	1035 \pm 41	73.5	98.1 \pm 4.2	7.0	88.7

En la presente invención se usa una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se** con número de depósito de patente **CECT13147** de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, capaz de crecer en medio conteniendo alta concentración de Selenito de sodio (10-100 mg/L). Por ejemplo; normalmente se usan medios de cultivo definidos o medios de cultivo ricos en los cuales se va incrementando de manera secuencial en cultivos batch la concentración de Selenito de Sodio hasta tener una concentración elevada entre 10 y 600 mg/L de Selenito de Sodio, con este método es posible recuperar cepas capaces de crecer en medios de cultivo con alta concentración de Selenito de Sodio sin merma en la producción de biomasa.

En la presente invención se usa una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2 denominada **LABGENMOLH04Se** con número de depósito de patente **CECT13147** de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, para el crecimiento en Selenito de Sodio para producir selenio orgánico en forma de Selenio metionina (SeMet) en altas concentraciones.

En la presente invención se usa una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se** con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, capaces de crecer y alcanzar mayores rendimientos en la producción de Selenio metionina en medios de cultivo con 10 -100 mg de Selenito de sodio /L de medio.

En la presente invención se usa una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se** con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, capaces de crecer en altas concentraciones de compuestos nocivos como el Selenito de sodio.

En la presente invención se usa una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se** con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, el cual tienen mayor tolerancia al estrés causado por la alta

concentración de Selenito de Sodio mediante la selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa.

En la presente invención se usa una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se** con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, capaz de crecer en Selenito de Sodio para producir selenio orgánico en forma de Selenio metionina (SeMet) en concentraciones entre 70 y 90 % en la fabricación de biomasa acumuladora de Selenio orgánico.

Aunque en los cultivos para obtener un microorganismo selenizado, se han utilizado varios géneros y especies de levaduras, como *Candida utilis* (documento de patente **CN101864369 (A) — 2010-10-20**) y *Candida tropicalis* (documento de patente **CN101792720 (A) — 2010-08-04**) entre otras, las cuales como ya se mencionó son patógenos emergentes, sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura de uso industrial por excelencia, y es un organismo reconocido generalmente como seguro para la salud (GRAS), por ello, es importante verificar el género y especie de los aislados obtenidos, una vez que se realizó la selección de cepas con mayor tolerancia al estrés causado por la alta concentración de Selenito de sodio mediante la selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa mediante evolución dirigida. La identidad de la cepa **LABGENMOLH04Se** se determinó mediante amplificación por PCR de la región intergénica ITS de los genes ribosomales (ITS1-5.8S-ITS2), su secuenciación (secuencia ITS **LGMH04.txt**; ver Listado de Secuencia) y análisis comparativo en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) indican que **LABGENMOLH04Se** corresponde a *Saccharomyces cerevisiae* ya que tiene una identidad de 99.9% con las secuencias ITS descritas para otras cepas de este género y especie (Figura 1 y Figura 2). La evolución dirigida y selección se inició con el inóculo madre de la cepa nativa Stock2 usada en las fermentaciones para producir biomasa para ser utilizada como suplemento alimenticio, con una concentración entre 0 y 600 mg de Selenito de Sodio/L de medio de cultivo, se recuperan las células viables, las cuales se van transfiriendo a un nuevo medio de cultivo incrementándose gradualmente la concentración de Selenito de Sodio, repitiendo el ciclo hasta llegar a la concentración deseada donde esperamos que crezcan los microorganismos

seleccionados. De esta manera se aisló la cepa que ha sido depositada en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia el 14 de junio de 2016: cepa **LABGENMOLH04Se**, con número de depósito de patente **CECT13147** atribuido por la Autoridad Internacional del Depósito. El depósito referido en la presente solicitud se
5 refiere al depósito ante la CECT, y tal depósito es mantenido bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con propósito de Patente.

La identificación molecular de la cepa se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando DNA genómico de la cepa y los oligonucleótidos: ITS1 (5'TCC GTA
10 GGT GAA CCT GCG G) y TS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), descritos por Esteve-Zarzoso *et al* (1999). Estos oligonucleótidos amplifican las secuencias ITS: ITS1 e ITS2 que son regiones no codificantes y variables; y el gen 5.8S del rRNA que es una región codificante y variable facilitando la discriminación entre distintos tipos de levaduras. Este fragmento de 848 pb fue secuenciado (secuencia ITS-LABGENMOL04Se) y al compararlo
15 en las bases de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostró una identidad entre 99.0 a 100 % con los ITS reportados de varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El alineamiento entre las secuencias (**Figura 1**), utilizando el programa DNASTar Lasergene 14 ClustalW mostró que tiene entre 99.0 y 100 % de identidad (**Figura 2**). Es decir, las sustituciones en las secuencias nucleotídicas del aislado es menor a 1%, por tanto, la identidad del aislado
20 denominado **LABGENMOL04Se**, obtenido de las fermentaciones para obtener biomasa con alto contenido de Selenio orgánico es *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de 848 pb de la región ITS de la cepa LABGENMOLH04Se (LGMH04Se) muestra diferencias discretas respecto a la cepa de referencia S288: en la posición 65-70 se observa una inserción de seis T, en la posición 310 hay una inserción de una T, en la posición 633 hay una inserción de una T, en la posición 644 hay un cambio de una A por una T y una delección de una T en la
25 posición 718 (ver **Figura 1**).

En la presente invención se usa una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se**, con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la
30 Universidad de Valencia, en el cultivo para la obtención de biomasa.

En la presente invención se usa una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se**, con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, en el proceso para la elaboración de biomasa enriquecida en Selenio orgánico, principalmente como Selenio metionina (ver **Tabla1**).

En la presente invención se usa una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada **LABGENMOLH04Se**, con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, en el proceso para la elaboración de biomasa enriquecida en Selenio orgánico, conteniendo bajos niveles de Selenio inorgánico (ver **Tabla1**).

En la presente invención se usa una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominado **LABGENMOLH04Se**, con número de depósito de patente **CECT13147**, de la Colección Española de Cultivos Tipo (**CECT**) de la Universidad de Valencia, la cual puede ser empleada para la elaboración de suplementos alimenticios con alto contenido de Selenio orgánico, más específicamente como Selenio-Metionina

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Proporcionar cepas con mayor tolerancia al estrés causado por la alta concentración de Selenio inorgánico (Selenito de sodio) mediante la selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa.

Usando la modalidad preferida de esta invención, a partir del aislado nativo de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante selección dirigida se aisló una cepa capaz de crecer con alto rendimiento de producción de Selenio orgánico (entre 70 y 90 %) en la fabricación de biomasa acumuladora de Selenio orgánico. El ensayo consistió en selección y enriquecimiento de estas variantes a partir de la población nativa de levaduras normalmente usadas para la obtención de biomasa.

De esta manera se aisló la cepa que ha sido depositada en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** de la Universidad de Valencia el 5 de mayo de 2016: cepa **LABGENMOLH04Se**, con número de depósito de patente **CECT13147** atribuido por la Autoridad Internacional del Depósito. El depósito referido en la presente solicitud se refiere

al depósito ante la CECT y tal depósito es mantenido bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con propósito de Patente.

5 EJEMPLO 2. Proporcionar cepas de levadura tolerantes a Selenito de sodio con buena capacidad de crecimiento y proliferación. Es frecuente que, en la búsqueda y aislamiento de variantes con características nuevas deseables, estas nuevas cepas destinan menos recursos al crecimiento y proliferación celular, lo cual desde el punto de vista de producción industrial de biomasa es indeseable, ya que puede comprometer el rendimiento final del producto
10 industrial deseado: biomasa acumuladora de alto contenido de Selenio orgánico.

Para ello, se compara la capacidad de crecimiento de la nueva cepa contra la cepa parental en las condiciones de no estrés. En cultivos independientes, la cepa a probar y la cepa parental, se siembran en medio rico, inoculando alrededor de 1×10^6 células de levadura por mL de medio rico, y se realiza el crecimiento a temperatura de 32-36 °C durante 12-24 h
15 recuperando las células al final de la incubación y se cuantifica el peso seco de la biomasa obtenido en la fermentación.

De manera que al final del proceso, con estas cepas se logra tener un crecimiento y proliferación medido como peso seco de la biomasa, similar al de la cepa parental (ver **Figura 3**).

20 También se compara la capacidad de crecer en medio con Selenito de sodio en cultivos en medio líquido con respecto al tiempo de incubación. El crecimiento y proliferación celular se evalúan cada cierto tiempo (cada 2-4 h) durante 24-48 h cuantificando la absorbencia a 660 nm. De manera que la cinética de crecimiento así obtenida muestra que la cepa **LABGENMOLH04Se** y la cepa parental Stock2 crecen de manera similar indicando que la
25 capacidad de tolerar el Selenio no afecta el crecimiento, por tanto, se puede tener una buena producción de biomasa con esta cepa (ver **Figura 4**).

EJEMPLO 3. Proporcionar cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a Selenito de sodio capaces de acumular elevadas cantidades de Selenio en la forma orgánica
30 Selenio metionina.

Para ello la cepa **LABGENMOLH04Se** se crece en un medio mínimo definido en presencia de Selenito de Sodio a una concentración inicial de 7-15 mg/L de medio. Se inocula alrededor de 1×10^6 células de levadura/mL de la cepa a probar y se realiza la fermentación durante 24-48 h de incubación en cultivo Batch con agitación en un biorreactor a temperatura (28-35 °C) y pH entre 7 y 3, enseguida se colectan las células, y se determina cuantitativamente la cantidad de Selenio total acumulado y se cuantifica la especiación como Selenio metionina y Se(IV) presente en la biomasa mediante el procedimiento de especiación HPLC-ICP-MS. LABGENMOLH04Se acumula más Selenio metionina que la cepa parental Stock2 (ver **Tabla 1**) aun cuando crecen de manera similar (**Figura 5**). En estas condiciones, la cepa LABGENMOLH04Se incluso acumula más Selenio metionina que la cepa de referencia “*Yeast Seleno Excell*” aprobada por la FDA (Yañez Barrientos, *et al*, 2016).

Hidrólisis de la levadura para la especiación del Selenio. Se siguió el método descrito por Yañez Barrientos *et al* (2016). 100 mg de biomasa se mezclan con 2 mL de ácido metasulfónico 4 mol/L, y se calienta a reflujo a 120 °C durante 16 horas. El hidrolizado se deshidrata y el residuo se suspende en 10 mL de ácido hepta-fluoro-butírico (HFBA) al 0.08 % m/v. Para cada muestra, la hidrólisis se realiza por triplicado.

Especiación del Selenio por HPLC-HG-MP-AES. Se lleva a cabo el método descrito por Yañez Barrientos *et al* (2016). La separación se realiza en columnas de HPLC en fase reversa usando ácido Heptafluorobutírico (HFBA) como reactivo de par iónico. Antes de la generación del hidruro, el eluido de la columna se mezcla con solución alcalina de persulfato de potasio y se calienta en baño de agua a 60°C, se añade ácido clorhídrico 10 M. Se coloca la muestra en el sistema de introducción de muestras multimodal, de la siguiente manera: el eluido de la columna pasa a través del canal inferior, el borohidruro de sodio es añadido a través del canal superior y de manera perpendicular a este último se introduce el gas de nebulización (**Figura 6**). La corrida cromatográfica y el sistema de detección se inician simultáneamente almacenándose los datos en Excel para su posterior tratamiento usando GRAMS 5.0 de Thermo Scientific. Para cada cromatograma, se aplica la filtración binomial y la extrapolación, seguido de filtración de Fourier 97 %. Para la calibración externa, se utilizan 8 soluciones conteniendo Se(IV) 0; 0.25; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; y 5.0 mg de Selenio/L y Selenio metionina 0; 2.5; 5; 10; 20; 30; 40; y 50 mg Selenio/L. La muestra de levadura

resuspendida se filtra con filtro Whatman de 0.22 μ diámetro de poro y posteriormente se inyecta en el cromatógrafo. Para el experimento de recuperación, la digestión de la muestra estándar, la Yeast Seleno Excell digerida es evaporada y resuspendida en 5 mL de HHBA 0.08 %. Se toman dos alícuotas de 1 mL y se diluyen, una con HFBA 1:1, y la segunda es
5 enriquecida con 500 μ L de Selenio metionina 40 mg de Selenio/L, 100 L de Se(IV) a 40 mg de Selenio/L, finalmente, se llevan a un volumen final de 2 mL con HFBA. Los dos estándares empleados correspondieron a 200 μ g de Se(IV) y 1000 μ g de Selenio/g de Selenio metionina en la biomasa de levadura. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Bibliografía

- Birt D.F.**, Lawson T.A., Julius A.D., Runice C.E., Salmasi S. (1982). Inhibition by Dietary Selenium of Colon Cancer Induced in the Rat by Bis(2-oxopropyl) nitrosamine. *Cancer Research*, 42:4455-59. 0008-5472/82/0042-0000S02.00
- 5 **Cruz Monterrosa R.G.**, Ramírez Bribiesca E., Cobos Peralta M.A., Revilla Vázquez A., Crosby Galván M.M., Cordero Mora J.L. (2011). Disponibilidad de selenio complementado con selenito de sodio y selenometionina en corderos. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXI, N° 1*, 31 – 8.
- Desnoyers M.**, Giger-Reverdin S., Bertin G., Duvaux-Ponter C., Sauvant D. (2009). Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *Journal of Dairy Science*, 92 :1620–1632 doi: 10.3168/jds.2008-1414.
- 10 **Golubev V.I.**, Golubev N.V. (2002). Selenium Tolerance of Yeasts. *Microbiology*, 71(4): 455–9.
- Hatfield D.L.**, y Gladyshev V.N. (2002). How Selenium has altered our understanding of the Genetic Code. *Molecular and Cellular Biology*, 22 (11): 3565–76 0270-7306/02/\$04.00_0 DOI: 10.1128/MCB.22.11.3565–3576.2002. Review.
- 15 **Jing C.L.**, Dong X.F., Wang Z.M., Liu S., Tong J.W. (2015). Comparative study of DL-selenomethionine vs sodium selenite and seleno-yeast on antioxidant activity and selenium status in laying hens. *Poultry Science* 94:965–975 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev045>
- Kieliszek M.**, Blazejak S. (2013). Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition* 29 713–718. Review. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.012>.
- 20 **Legrain Y.**, Touat-Hamici Z., Chavatte L. (2014). Interplay between Selenium Levels, Selenoprotein Expression, and Replicative Senescence in WI-38 Human Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 289(9): 6299–310,
- Mahan D.C.** (2000). Effect of organic and inorganic selenium sources and levels on sow colostrum and milk selenium content. *Journal of Animal Science*, 78:100–5.
- 25 **Mapelli V.**, Hillestrom P.R., Patil K., Larse E.H., Olsson L. (2011). The interplay between Sulphur and Selenium, metabolism influences the intracellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies, Yeast Research*, 12:20-32. DOI:10.1111/j.1567-1364.2011.00757.x
- Ogawa-Wong A.N.**, Berryand M.J., Seale L.A. (2016). Selenium and Metabolic Disorders: An Emphasis on Type2 Diabetes Risk. *Nutrients*, 8: 80. DOI:10.3390/nu8020080. Review.
- 30 **Rayman M.** (2004) The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?. *British Journal of Nutrition*, 92: 557–73 DOI: 10.1079/BJN20041251.
- Sonkusre P.**, Nanduri R., Gupta P., Singh Cameotra S. (2014). Improved extraction of intracellular biogenic selenium nanoparticles and their specificity for cancer chemoprevention. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 5(2). <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000194>
- 35 **Williams R.**, Dias D.A., Jayasinghe N., Roessner U., Bennett L.E. (2016). Beta-glucan-depleted, glycopeptide-rich extracts from Brewer's and Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) lower interferon-gamma production

by stimulated human blood cells in vitro. Food Chemistry, 197: 761-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.015>.

Yañez Barrientos E., Wrobel K., Torres Guzman J.C., Corralres Escobosa A.R., Wrobel K. (2016).
5 Determination of SeMet and Se(IV) in biofortified yeast by ion-pair reversed phase liquid chromatography-
hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HPLC_HG_MP_AES).
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 31:203-11. DOI: 10.1039/c5ja00276a.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (LABGENMOLH04Se) depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito de patente CECT13147 caracterizada porque es capaz de crecer y fermentar en medios de cultivo con concentraciones de 10-100 mg/L Selenito de sodio el cual es transformado a Selenio metionina.
2. La cepa descrita en la reivindicación 1, caracterizada porque durante su proceso de fermentación se obtiene biomasa acumuladora de Selenio orgánico con concentraciones de 70-90 % de Selenio metionina del selenio total.
3. Uso de la cepa descrita en la reivindicación 1, para la elaboración de biomasa enriquecida en Selenio orgánico conteniendo bajos niveles de Selenio inorgánico.
4. Uso de la cepa descrita en la reivindicación 1 para la elaboración de suplementos alimenticios con contenido de Selenio orgánico.
5. Uso de la cepa descrita en la reivindicación 1 para la elaboración de suplementos alimenticios con contenido de Selenio orgánico, más específicamente como Selenio metionina.

RESUMEN

La presente invención se refiere al uso de una cepa del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de la cepa Stock2, denominada LABGENMOLH04Se con número de depósito de patente CECT13147, de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia. Esta cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de crecer en medios conteniendo altas cantidades de Selenito de Sodio y convertirlo eficientemente y acumularlo principalmente como Selenio Metionina (SeMet), constituyendo el Selenio orgánico (SeMet) más del 80 % del Selenio total de la célula, el cual según lo reportado, el Selenio metionina es el principal compuesto de Selenio benéfico para la salud de los seres vivos, pudiendo ser utilizado como suplemento alimenticio, además de las ventajas inherentes al consumo de levadura.

Porcentaje de Divergencia	Porcentaje de Identidad			
	1	2		
1		99.9	1	SC28 LGMH04S
2	0.1		2	
	1	2		

Figura 2

3/6

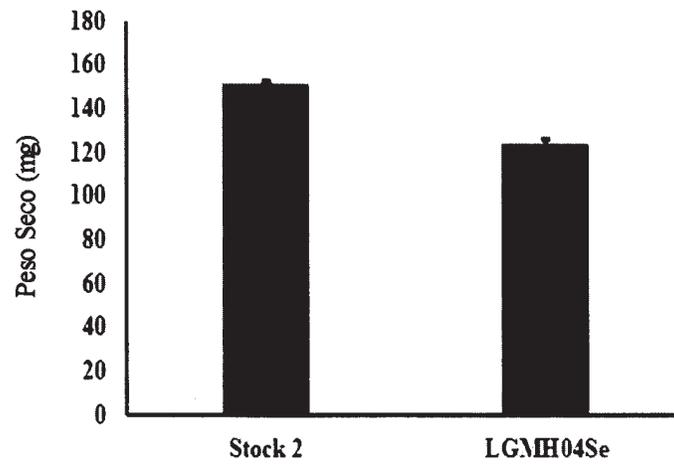


Figura 3

4/6

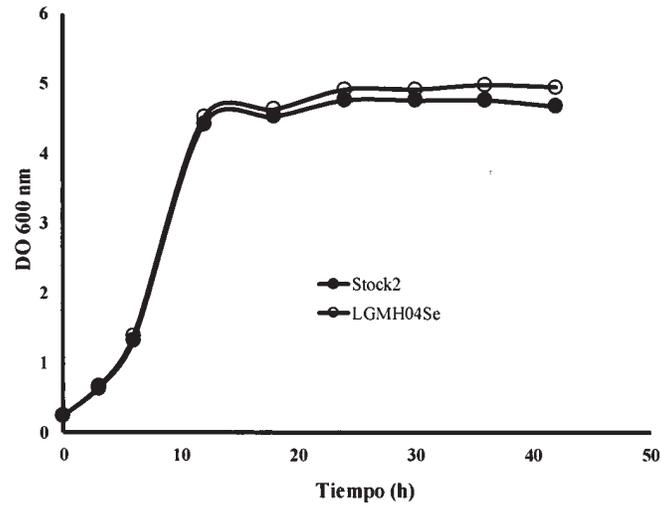


Figura 4

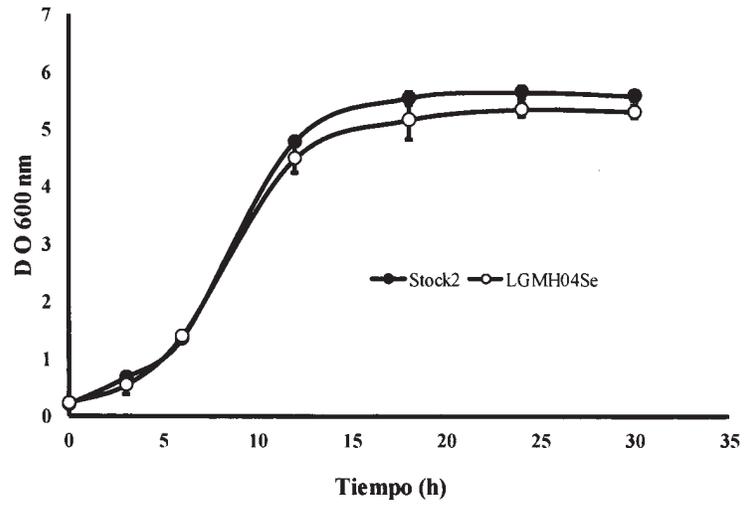


Figura 5

6/6

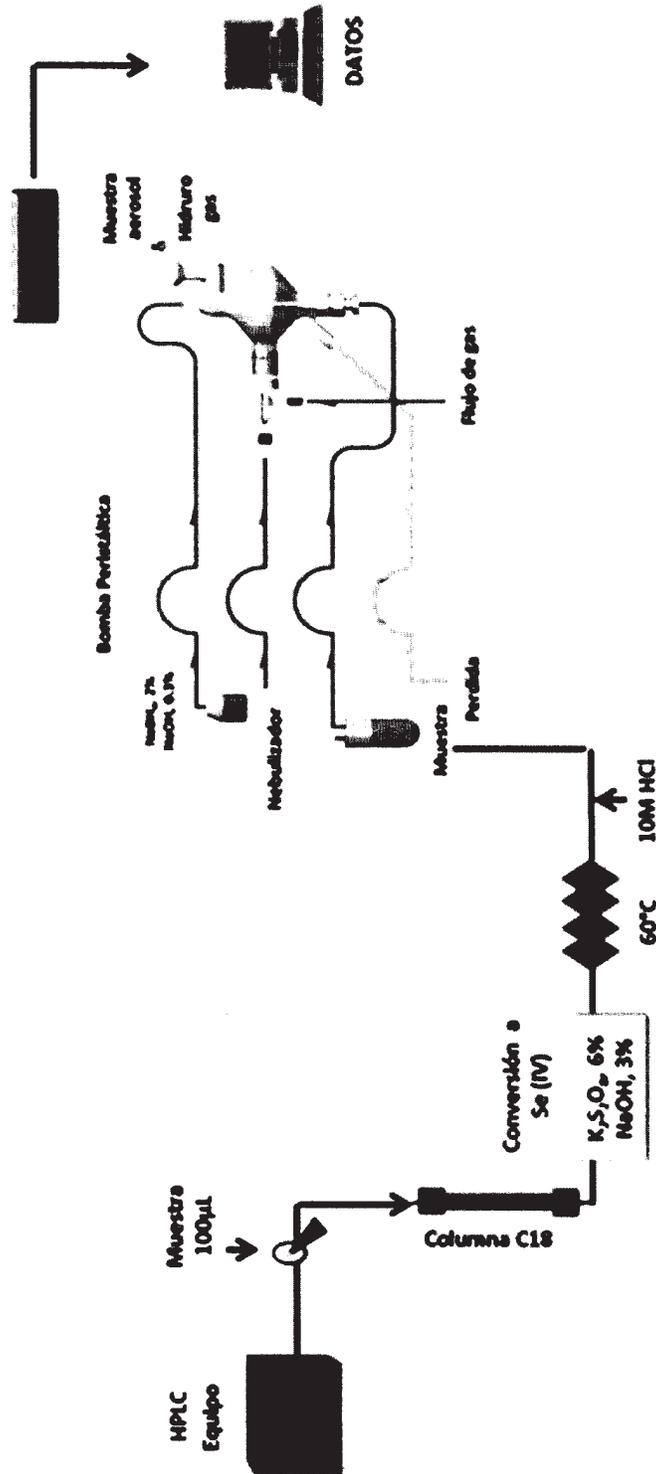


Figura 6

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQUENCE LISTING

<110> Universidad de Guanajuato
Gonzalez Hernandez, Gloria Angelica
Torres Guzman, Juan Carlos
Padilla Guerrero, Israel Enrique
Garcia Vera, Victor Manuel
Vargas Maya, Nauru Idalia
Ramirez Zuñiga, Maria del Rosario
Garcia Tapia, Adriana

<120> Levadura con alto contenido de Selenio orgánico,
principalmente
como Selenio-Metionina (SeMet)

<130> no aplica aun

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 848
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> KX951644
<222> (1)..(30)
<223> Region variable 18S rRNA

<220>
<221> KX951644
<222> (31)..(398)
<223> Region no codificante variable intergénica ITS1-1

<220>
<221> KX951644
<222> (399)..(557)
<223> Region codificante variable 5.8 S rRNA

<220>
<221> KX951644

2/2

<222> (558)..(788)
<223> Region no codificante variable ITS 2-1

<220>
<221> KX951644
<222> (789)..(848)
<223> Region codificante variable 25S rRNA

<300>
<308> KX951644
<309> 2016-10-06
<313> (1)..(848)

<400> 1

tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta aagaaattta ataattttga aaatggattt	60
tttttttttt gttttggcaa gagcatgaga gcttttactg ggcaagaaga caagagatgg	120
agagtccagc cgggcctgcg ctttaagtgcg cggctctgct aggcttgtaa gtttctttct	180
tgctattcca aacggtgaga gatttctgtg cttttgttat aggacaatta aaaccgtttc	240
aatacaacac actgtggagt tttcatatct ttgcaacttt ttctttgggc attcgagcaa	300
tcggggccca gaggttaaca aacacaaaca atttatcta ttcattaaat ttttgtcaaa	360
aacaagaatt ttcgtaactg gaaattttaa aatattaaaa actttcaaca acggatctct	420
tggttctcgc atcgatgaag aacgcagcga aatgcgatac gtaatgtgaa ttgcagaatt	480
ccgtgaatca togaatcttt gaacgcacat tgcgcccctt ggtattccag ggggcatgcc	540
tgtttgagcg tcatttcctt ctcaaacatt ctgtttggtg gtgagtgata ctctttggag	600
ttaacttgaa attgctggcc ttttcattgg atgttttttt ttccaaagag agatttctct	660
gcgtgcttga ggtataatgc aagtacggtc gttttaggtt ttaccaactg cggctaactc	720
ttttataact gagcgtattg gaacgtatc gataagaaga gagcgtctag gcgaacaatg	780
ttcttaaagt ttgacctcaa atcaggtagg agtaccgct gaacttaagc atatcaataa	840
gcggagga	848