

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 069**

51 Int. Cl.:

C12N 1/18 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00108636 .2**

96 Fecha de presentación: **20.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1148121**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2001**

54 Título: **Método para introducir propiedades recesivas en una levadura de panadería**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2012

73 Titular/es:
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
Case postale 353
1800 Vevey , CH

72 Inventor/es:
Gysler, Cristof y
Niederberger, Peter

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 382 069 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para introducir propiedades recesivas en una levadura de panadería

5 La presente invención se refiere a un nuevo método para introducir de manera estable una propiedad de una cepa particular de levadura. Esta propiedad, basada en un alelo recesivo, por ejemplo una propiedad lti, se introduce en la estructura genética de una levadura de panadería industrial. La presente invención se refiere asimismo a cepas de levadura que pueden obtenerse según el método descrito, el cual se puede usar para preparar una masa y elaborar con ella productos horneados a escala industrial.

10 El mercado ofrece actualmente a los consumidores diversos productos en forma de masa para elaborar diferentes tipos de productos horneados, como por ejemplo masas de pizza, bollos, cruasanes, etc. Estos productos se pueden dividir genéricamente en dos grupos principales, basándose en el proceso de fermentación de la masa, es decir, aquellos cuya masa es fermentada por agentes químicos y aquellos cuya masa fermenta mediante la acción de la levadura de panadería que contiene.

15 El uso de agentes químicos para fermentar la masa es corriente y tiene la ventaja de que su comportamiento está basado en una reacción química predecible que permite controlar específicamente el volumen de dióxido de carbono producido para leudar la masa. Como la cantidad de dióxido de carbono y el momento en que se produce pueden controlarse, la elaboración de los productos horneados también puede tener lugar tras un tiempo de almacenamiento prolongado de la masa.

20 Sin embargo los productos finales horneados de esta manera son en general de calidad inferior, en comparación con los productos fermentados con levadura de panadería. En concreto dichos productos tienen una textura a menudo inaceptable para los clientes y carecen de compuestos saborizantes aportados por la levadura durante su acción fermentadora.

25 Por esta razón los productores de alimentos horneados tratan más bien de evitar el uso de estos agentes químicos en sus productos y dependen del empleo de levadura de panadería. Sin embargo los productos que contienen la levadura corriente de panadería adolecen de diversos problemas inherentes a la utilización de "microorganismos vivos" como tales.

30 Uno de estos problemas reside en el hecho de que la actividad de la levadura en una masa no puede controlarse directamente. Por este motivo las masas en cuya composición entra levadura solo se pueden conservar durante un periodo de tiempo muy limitado, pues en las condiciones normales de almacenamiento – tales como a temperatura ambiente o a temperaturas incluso inferiores, como p.ej. las reinantes en una nevera – la levadura de panadería corriente muestra una actividad sustancial que se manifiesta en una producción constante de dióxido de carbono. Esta actividad continua de la levadura de panadería corriente, más allá del grado de fermentación deseado, afecta las propiedades organolépticas y reológicas de la masa y da como resultado unos productos finales inaceptables en cuanto a sabor y textura.

35 Un método para evitar este problema concreto ha consistido en guardar la masa con hecha levadura, opcionalmente en forma prehorneada, a temperaturas de congelación próximas a -20°C, a fin de reducir al mínimo la actividad de la levadura.

40 A este respecto la patente EP-0 442 575 revela el empleo de una composición de masa basado en el concepto de limitación de substrato. Para ello se fermenta una masa con una levadura negativa de maltasa, hasta consumir todos sus componentes directamente fermentables y a continuación se congela dicha masa para un almacenamiento prolongado. Antes del consumo la masa se descongela y se leuda de nuevo con agentes químicos. Sin embargo este método también ha resultado insatisfactorio, porque los productos preparados a partir de composiciones de masas congeladas son menos convenientes para el consumidor que los productos de masa fresca, p.ej. refrigerada. La masa congelada tiene que ser descongelada y en muchos casos refermentada antes de hornear, lo cual requiere un control por parte del consumidor para evitar una fermentación exhaustiva de la masa. Además se ha demostrado que la textura de los productos finales horneados derivados de masas congeladas es inferior a la de los productos elaborados con masas no congeladas y el sabor característico asociado a la fermentación con levadura también es inferior o a menudo no existe en absoluto.

45 Otro método para resolver el problema de almacenamiento de las composiciones de masa fresca que contienen levadura ha sido el desarrollo y la utilización en la masa de cepas de levadura inactivas a baja temperatura. Estas cepas de levadura son esencialmente inactivas a bajas temperaturas, pero conservan su actividad cuando se llevan a temperaturas superiores, es decir, a temperaturas de fermentación.

50 En la patente EP-0 487 878 se describe un proceso para construir cepas de levadura que tengan propiedades lti, el cual consiste en someter una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* a un tratamiento mutagénico, seleccionar al menos un mutante que tenga una propiedad lti y retrocruzarlo al menos una vez con una cepa haploide de *Saccharomyces cerevisiae* natural que tenga un tipo sexual opuesto, seleccionando al menos dos segregantes retrocruzados con

propiedad lti y tipos de apareamiento opuestos y cruzándolos, como mínimo una vez, con lo cual se obtiene y se selecciona una cepa diploide que tiene potencial de crecimiento, una propiedad lti y capacidad de levantar una masa.

5 También se ha descrito la construcción de diferentes derivados lti. Así, en la patente EP-0 663 441 se describe un proceso para construir cepas lti que reaccionan más lentamente con la maltosa contenida en la masa. Estas cepas se pueden obtener cruzando un haploide de *Saccharomyces cerevisiae* que tenga la propiedad lti con una cepa haploide de *Saccharomyces cerevisiae* que tenga un gen con actividad de maltasa bajo represión catabólica y luego los segregantes, y seleccionando una cepa diploide que muestre una propiedad lti, un fenotipo Mal activo (Mal⁺), que
10 exprese el gen codificador de la maltasa - bien induciblemente (tipo natural) o constitutivamente - y tenga un potencial de crecimiento.

No obstante, desde el punto de vista de la elaboración industrial, uno de los mayores problemas encontrados al preparar composiciones de masa o alimentos horneados a partir de ellas reside en que deben utilizarse cepas de
15 levadura que permitan una producción a gran escala de masa a costes razonables.

Para ello la cepa de levadura debe tener un gran rendimiento, una elevada producción de biomasa y/o una buena secabilidad. Actualmente solo hay un número limitado de cepas que permita producir a escala industrial dichas composiciones de masa, pues la razón genética, es decir los genes causantes de estas propiedades, aún no ha sido
20 aclarada. Como ejemplos de tales cepas cabe mencionar las levaduras Levure Boulangère Bleue, que vende Lesaffre et Cie, Paris, Francia, Fermipan (Fermipan Red, de Gist-Brocades, Delft, Holanda), Netherlands o HS, de Hefe Schweiz, Stettfurt, Suiza.

No obstante, aunque manifiestan la mayoría de las propiedades tecnológicas citadas, es difícil hasta la fecha que
25 estas cepas industriales puedan desarrollarse hacia la adquisición de nuevas características especiales, tales como p.ej. inactividad a baja temperatura o desrepresión por glucosa o carencia de trehalasa o una o varias auxotrofias.

Por tanto es necesario un estado técnico que permita al especialista introducir estas propiedades en la estructura genética de las levaduras de panadería industrial. Sin embargo, como estas propiedades de las cepas de levadura se basan casi siempre en (a) alelo(s) recesivo(s), combinar una propiedad de este tipo con las propiedades de una
30 cepa industrial no es tarea fácilmente loguable.

Por consiguiente es un problema de la presente invención proporcionar medios para introducir propiedades de cepas conocidas en la estructura genética de las levaduras de panadería industrial y aportar nuevas cepas de levadura que
35 tengan tanto la propiedad proporcionada por el alelo recesivo como las propiedades aportadas por la levadura de panadería industrial.

Este problema se ha resuelto mediante un método que comprende las etapas de (a) selección haploide de una levadura que tenga la propiedad deseada, (b) diploidización de la levadura seleccionada en (a) y selección de un
40 tipo sexual homocigótico, (c) diploidización de una levadura de panadería industrial y selección de un tipo sexual homocigótico, (d) apareamiento de las cepas obtenidas arriba en (b) y (c) que tengan un tipo sexual recíprocamente opuesto, para obtener un cigoto tetraploide, (e) esporulación del cigoto obtenido en (d), (f) selección de cepas que presenten la propiedad recesiva y (g), opcionalmente, apareamiento de las cepas seleccionadas en (f) que tengan un tipo sexual opuesto.

45 Como ejemplos de propiedades conocidas, basadas en alelos recesivos, que se combinan con las propiedades de las levaduras de panadería industrial, cabe citar las siguientes: las que provienen de represores de glucosa inactivos o de trehalasa(s) inactiva(s), auxotrofias y la propiedad de lti. Según una forma de ejecución preferida el alelo que debe introducirse es un alelo lti. Como ejemplos específicos cabe citar los alelos de un gen represor de catabolitos (p.ej. *MIG1* o *HXK2*) que desreprime los genes de utilización de maltosa y permite una adaptación más rápida de la levadura desarrollada en sacarosa a la principal fuente de carbono de la harina; alelos no funcionales de genes involucrados en la degradación de la trehalosa (como: trehalasa neutra (*NTH1*) o trehalasa ácida (*ATH1*), evitando así una degradación rápida de la trehalosa y aumentando indirectamente el contenido de trehalosa en la levadura, con lo cual se hace más resistente en situaciones de tensión (como p.ej.: secado, congelación, resistencia a niveles
50 tóxicos de etanol); o alelos auxótrofos (p.ej. *ura3*, *leu2*, etc.), que permiten seleccionar plásmidos.

Según la presente invención es posible obtener nuevas cepas de levadura. Estas cepas conservan en concreto la "capacidad industrial" manifestada por la "levadura industrial" original, p.ej.:

- 60 – una producción de biomasa 0,1 - 0,5 g derivada de 1 g de azúcar, en un proceso discontinuo alimentado,
- ninguna producción sustancial de etanol durante la producción de biomasa con levadura en el proceso discontinuo alimentado,
- una actividad en una masa formada por 56,4% p/p de harina, 42,3% p/p de agua, 1,15% p/p de NaCl y 0,15% p/p de (NH₄)₂SO₄ que, al usar 160 mg de levadura seca en 35 g de la masa modelo, produce al menos 30 ml de dióxido de carbono a 30°C durante un periodo de incubación de 2 horas.

Las cepas resultantes muestran las propiedades de la cepa industrial original y la(s) propiedad(es) derivada(s) del alelo o alelos recesivos de la cepa poseedora de la(s) propiedad(es) que debe(n) introducirse en la estructura genética de la levadura de panadería industrial, tal(es) como auxotrofia(s), desrepresión de glucosa, inactividad(es) de trehalasa, preferiblemente una mutación lti.

5 Según otra forma de ejecución preferida la cepa de levadura es tetraploide, pues estas cepas tienen un tamaño mayor que las hace específicamente adecuadas para las etapas de filtración durante el proceso de producción.

10 Según otra forma de ejecución preferida, la levadura lti de la presente invención tiene la capacidad de producir a temperaturas de frigorífico comprendidas entre 3°C y 12°C una cantidad de dióxido de carbono inferior a 3 ml, preferiblemente inferior a 1 ml de CO₂/por hora/por g de masa (160 mg de levadura seca en 35 g de una masa que contiene (p/p) 56,4% de harina, 42,3% de agua, 1,15% de NaCl y 0,15% de (NH₄)₂SO₄).

15 Según otra forma de ejecución preferida las cepas de levadura presentan un perfil de producción de CO₂ que incluye una actividad a temperaturas de fermentación que es superior a la actividad de las cepas de las cuales proceden, es decir las cepas industriales originales y/o la cepa lti original y después una actividad a la temperatura del frigorífico (unos 3-12°C) que es mayor en comparación con la actividad de la cepa lti original.

20 Las cepas de levadura que presentan este tipo de perfil de producción de CO₂ son interesantes para el suministro de composiciones de masa, porque aportan una ventaja adicional. Con estas cepas será posible introducir una menor cantidad de levadura en la masa, gracias a la mayor actividad de la levadura a temperaturas de aproximadamente 30°C (temperaturas de fermentación), logrando incluso los mismos resultados al elevar la masa. Como alternativa se puede prolongar el tiempo de almacenamiento de la composición de la masa, pues al haber menos levadura en la masa disminuye el riesgo de que sobrefermentación durante el almacenamiento.

25 La cepa puede ser FCL 313 (NCIMB 41002), CL14 (NCIMB 41032) o CL18 (NCIMB 41033), las cuales han sido depositadas en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. [*Colección nacional de bacterias industriales y marinas, S.L.*] (Aberdeen, Escocia, RU) de acuerdo con el tratado de Budapest.

30 La cepa FCL 313 se puede emplear para preparar composiciones de masa y finalmente para elaborar productos horneados. Por tanto la presente invención también debe incluir los productos preparados con la cepa de levadura según la presente invención.

35 Según una forma de ejecución preferida, las nuevas cepas lti conforme a la presente invención que muestran un "comportamiento industrial" son cepas que expresan el gen de la maltasa constitutiva o no constitutivamente. Por otra parte, para evitar una actividad excesiva de la levadura - debida p.ej. al consumo de la maltosa presente en la masa - se puede seleccionar la levadura lti original que sea reprimida por otros componentes presentes. En las composiciones de masa que contienen las cepas de levadura lti según la presente invención se pueden emplear adicionalmente otras cepas de levadura lti que tengan distintos fenotipos/genotipos. Por consiguiente se puede usar p.ej. una mezcla de las nuevas cepas lti con cepas lti comunes tales como las cepas Mal⁻ lti (una cepa de levadura incapaz de metabolizar maltosa) o las cepas Mal⁺ lti. El especialista puede seleccionar una mezcla apropiada entre las cepas lti disponibles, teniendo en cuenta los factores que influyen en la actividad de la levadura, tales como la presencia de maltosa, la temperatura, opcionalmente otros azúcares presentes, etc., para adaptar la composición de la masa al perfil de CO₂ deseado.

45 El método para preparar composiciones de masa consiste en mezclar agua, harina y al menos una de las nuevas cepas de levadura. Como harina se puede usar cualquiera de las disponibles en el comercio, pero en caso de ser ventajoso se emplearía harina que contuviera cierta cantidad de almidón dañado, el cual puede servir como fuente de azúcar para las presentes cepas de levadura. El agua se añade generalmente según la capacidad de hidratación de la harina y la potencial influencia de otros componentes contenidos en la masa, capaces de aumentar o reducir su capacidad, hasta formar una masa trabajable. Opcionalmente la masa puede contener sales, preferiblemente cloruro sódico, en una cantidad de 0 a 8 partes en peso respecto a la cantidad de 100 partes en peso de harina. También puede incluirse etanol en una cantidad de 0 a 8 partes en peso, igualmente respecto a la cantidad de 100 partes en peso de harina.

50 La levadura puede añadirse seca, rehidratada en toda o en una parte del agua empleada para preparar la masa. Se puede contemplar asimismo el uso de una torta prensada con un contenido de materia seca de un 20 a 40% o de una crema de levadura con un contenido de materia seca de un 10 a 20%, ajustando correspondientemente el agua por añadir a la harina.

60 El método para producir las nuevas cepas de levadura comprende las etapas (a) a (f) y opcionalmente la etapa (g).

65 En la etapa (a) se seleccionará la cepa de levadura original que muestre la propiedad deseada, basada en un alelo recesivo.

De cara a posteriores tratamientos esta cepa debe encontrarse en una forma diploide que sea homocigótica para su

tipo sexual. Así tienen lugar las siguientes opciones teóricas.

La cepa ya es diploide y también muestra un tipo sexual homocigótico, es decir a/a o α/α . Sin embargo en muchos casos no será así y por tanto las cepas tendrán que hacerse por encargo.

5 Cuando se parte de una cepa de levadura diploide que no es homocigótica para su tipo sexual o incluso cuando se parte de una cepa tetraploide, primero hay que convertirlas en una forma haploide, lo cual puede lograrse por esporulación de las cepas según métodos bien conocidos del estado técnico, tales como p.ej. los descritos en Sherman, F.G.R. y otros, *A Laboratory course manual in yeast genetics [Manual de curso de laboratorio sobre genética de levaduras]* (1986), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Este método incluye p.ej. la disección de un asca con un micromanipulador. Para ello se transfiriere un bucle de un cultivo esporulado a agua estéril y se le agrega baba de caracol (Suc d'Helix pomatia, Biosepra, Francia). La digestión se efectúa durante varios minutos hasta que las esporas empiezan a desprenderse de las ascas, luego se separan y se extienden sobre placas de agar. Al incubar, las esporas producirán colonias formadas por células de levadura haploide.

15 Estos haploides segregados presentan un tipo sexual a o α que se puede comprobar en cruces con cepas estándar tales como X2180-1A (a) o X2180-1B (α) (obtenidas del Yeast Genetic Stock Center, Department of Molecular and Cellular Biology, Division of Genetics, University of California, Berkeley, CA 94720, USA). El tipo sexual de un segregante se define por su capacidad de formar cigotos con una cepa de control del tipo sexual opuesto y por su incapacidad de formarlos con una cepa de control del mismo tipo sexual. Luego pueden seleccionarse las cepas que muestren la propiedad deseada.

25 A continuación se diploidizan de nuevo las correspondientes cepas haploides, lo cual se puede llevar a cabo, por ejemplo, aprovechando el fenómeno de la diploidización espontánea (véase Sherman, arriba citado). Para ello se pueden cultivar las respectivas cepas haploides en un medio líquido idóneo durante varias semanas a temperatura ambiente o a temperaturas ligeramente superiores, en agitación, efectuando regularmente subcultivos a intervalos. De cuando en cuando se pueden introducir células en placas YPD (abajo) y seleccionar variedades especialmente grandes de las colonias cultivadas. Cuando se encuentran colonias grandes, su ploidía puede comprobarse por retrocruzamiento con cepas de control de ploidía conocida. Una cepa de ploidía desconocida (haploide o diploide) que aún presente un tipo sexual (a o a/a ; α o α/α) se cruza con cepas de control de ploidías conocidas (haploide o diploide). Los cigotos resultantes serán diploides (haploide x haploide), triploides (haploide x diploide) o tetraploides (diploide x diploide). Estos cigotos se esporulan y se aísla un número representativo de esporas por disección del asca, tal como se ha descrito arriba. Los cigotos triploides se identifican fácilmente por la reducida viabilidad de las esporas (normalmente 0-10%), mientras que los cigotos de ploidía par (diploide o tetraploide) suelen dar viabilidades de esporas superiores al 50%. Por tanto un segregante haploide dará altas viabilidades de esporas en cruces con una cepa de control haploide, pero viabilidades bajas con una cepa de control diploide, mientras que un segregante diploide da una baja viabilidad de esporas con una cepa de control haploide, pero una viabilidad elevada con una cepa de control diploide.

40 Por otra parte, partiendo de una cepa haploide solo hay que llevar a cabo la diploidización arriba detallada.

Luego las cepas diploides así obtenidas que tienen un tipo sexual a/a o α/α y que son homocigóticas para introducir el rasgo deseado en la estructura genética de la levadura de panadería se pueden usar en las siguientes etapas del proceso.

45 En cuanto a la levadura de panadería industrial de la etapa (c) se esporula una levadura tetraploide de panadería industrial (como LBB, HS, Fermipan, etc.) y se seleccionan los segregantes diploides que muestran un tipo sexual y por tanto son homocigóticos para a/a o α .

50 En la etapa (d) del presente proceso las cepas diploidizadas que poseen el rasgo específico y la levadura de panadería industrial, cada una con un tipo sexual concreto, se combinan de manera conocida (Sherman, arriba citado) con un tipo sexual opuesto, es decir a/a con α/α , para dar un cigoto tetraploide $aa/\alpha\alpha$. Después los cigotos tetraploides resultantes de este cruce de las cepas diploides originales se esporulan de nuevo en la etapa (e) y se aíslan las esporas meióticas. Las esporas obtenidas por la esporulación se seleccionan según el rasgo específico que deba conferirse a la estructura genética de la levadura de panadería (etapa (f)).

55 Según una forma de ejecución preferida las cepas diploides obtenidas mediante las etapas de proceso (a) hasta (f) se pueden seguir poliploidizando. Para ello se comprueba que las cepas obtenidas en (f) sean homocigóticas para su tipo sexual y se cruzan las que tienen tipo sexual opuesto. Las cepas poliploidizadas tienen una ventaja adicional en la industria, pues debido a su tamaño ampliado pueden filtrarse más fácilmente.

60 Entre las cepas industriales se puede emplear cualquiera que sea adecuada, tal como las cepas comercialmente disponibles Fermipan Standard ("Fermipan Red", una levadura seca de actividad instantánea, de Gist-Brocades, Holanda) o LBB ("Levure Boulangère Bleue", de Le Saffre, Francia) o HS (que puede adquirirse de Hefe Schweiz, CH). El especialista escogerá la cepa apropiada basándose en su propia experiencia técnica y en función de la respectiva estructura genética en la que debe introducirse la propiedad lti. Como algunas de las cepas industriales

conocidas son de naturaleza tetraploide, primero hay que diploidizarlas antes de combinarlas con las cepas diploides que poseen el rasgo deseado.

5 En una forma de ejecución preferida la cepa que presenta un trato deseado es una cepa lti tal como la L500 [NCIMB 40329], cuyo proceso de construcción se describe detalladamente en la patente EP-0 487 878, documento que se incluye aquí como referencia, o la LCG22 [NCIMB 40612], cuyo proceso de construcción se describe detalladamente en la patente EP-0 663 441, documento que se incluye aquí como referencia.

10 Seguidamente la presente invención se describe haciendo referencia a las formas de ejecución preferidas y a las figuras, donde:

La fig. 1 muestra la producción de CO₂ obtenida de cepas a 30°C y 8°C, respectivamente.

La fig. 2 muestra una gráfica que ilustra la producción de CO₂ de diferentes cepas a distintas temperaturas en índices absolutos.

15 La fig. 3 muestra una gráfica que ilustra la producción de CO₂ de diferentes cepas a distintas temperaturas en índices relativos.

Ejemplo 1

20 Construcción de nuevas cepas

Para introducir características industriales en una levadura lti se ha empleado un mutante lti lts500 NCIMB 40613] que tiene el siguiente genotipo:

25 α lts500

Esta cepa se cruzó con la cepa fermentadora de maltosa 1403-7A

a MAL4c ura3

30 (obtenida del Yeast Genetic Stock Center, Department of Molecular and Cellular Biology, Division of Genetics, University of California, Berkeley, CA 94720, USA)

(las letras mayúsculas indican alelos dominantes; las letras minúsculas alelos recesivos).

35 Se esporuló el cigoto (Sherman, arriba citado) y se aislaron esporas meióticas del modo siguiente. Se suspendió un bucle de cultivo en 0,2 ml de agua estéril contenida en un tubo Eppendorf y se añadieron 0,02 – 0,04 ml de baba de caracol (Suc d'Helix pomatia, Biosepra, Francia). La suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 4 – 15 min. El tiempo varió de cepa a cepa, mientras que el tiempo apropiado se observó mediante un microscopio y se consideró más o menos justo cuando las esporas empezaron a desprenderse de las ascas. Esto se manifestó por medio de "ondas explosivas" en el líquido y por una alineación más suelta de las envolturas de las esporas. Después de la incubación se añadió 1 ml de agua estéril y la suspensión se centrifugó durante unos 5 min. Se aspiró el sobrenadante y el precipitado se suspendió en aproximadamente 0,5 ml de agua estéril, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Después de suspender las esporas en aproximadamente 0,5 ml de agua estéril, la suspensión se extendió con un asa fina de platino en el borde de un parche de disección de agar (2% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 0,5% de peptona, 2% de agar) cortado al tamaño apropiado. Se diseccionaron las tétradas con unas separaciones de 2,5 mm entre las esporas y 3 mm entre cada tétrada, utilizando un micromanipulador Leitz (Leitz, Alemania). Los parches de agar se transfirieron a placas de agar-YPD (medio YPD completo (solidificado con 2% de agar Bacto (Difco), 1% de extracto de levadura Bacto, 2% de peptona Bacto (Difco), 2% de glucosa) y se incubaron a 30°C hasta que las esporas formaron colonias, las cuales se transfirieron seguidamente con mondadientes a nuevas placas de agar-YPD (véase arriba) para posterior análisis.

50 Se ensayó el tipo sexual de los segregantes haploides así obtenidos, a o α , respectivamente, cruzándolos con cepas estándar tales como X2180-1A (a) o X2180-1B (α) disponibles en el Yeast Genetic Stock Center, Department of Molecular and Cellular Biology, Division of Genetics, University of California, Berkeley, CA 94720, USA).

55 El ensayo se realizó del modo siguiente. Las cepas se cultivan durante la noche sobre placas de agar-YPD (1% de extracto de levadura Bacto Difco, 2% de peptona Bacto Difco, 2% de glucosa, 2% de agar). Se mezclan pequeños alícuotas del segregante con un pequeño alícuota de una cepa de control-a y un pequeño alícuota de una cepa de control- α sobre una placa YPD con la ayuda de un mondadientes de madera estéril. Después de 5-6 h de incubación a 30°C se analizaron microscópicamente ambas mezclas al formarse los cigotos.

60 Como la cepa original era homocigótica para la mutación lti, todos los segregantes presentaron un claro fenotipo lti y fueron fermentadores de maltosa (Mal⁺) o no fermentadores de maltosa (Mal⁻) y protótrofos (URA3) o auxótrofos (ura3) de uracilo, determinados por procedimientos estándar (Sherman, F.G.R. y otros, A Laboratory course manual in yeast genetics [*Manual de genética de levaduras para un curso de laboratorio*] (1986), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y).

65

Para obtener aislados diploides de las diversas cepas haploides resultantes, se aprovechó el fenómeno de la diploidización espontánea. A tal fin, una cepa haploide dada se cultivó en un medio YPD líquido (véase arriba) durante 12 semanas a unos 30°C en agitación, efectuando regularmente subcultivos a intervalos de unos 3 - 4 días. De cuando en cuando se introdujeron células en placas YPD y se seleccionaron variedades especialmente grandes de las colonias cultivadas. Cuando se encontraron colonias grandes, se comprobó su ploidía por retrocruzamiento con una serie de cepas de control haploides (X2180-1A (a), X2180-1B (α), véase arriba) o diploides (X2180-1A/1A (a/a), X2180-1B/1B (α/α), colección de cepas ETHZ, Eidgenössisch Technische Hochschule, Zürich, Suiza).

Por consiguiente se seleccionaron las cepas que presentaban las siguientes propiedades:

- a) los diploides eran homocigóticos para la mutación *Its 500* y mostraban un fenotipo *Iti* claro;
- b) los diploides eran homocigóticos para el alelo *URA3* natural y tenían un fenotipo prototrófico;
- c) los diploides llevaban al menos un alelo *Mal4c* para dar un fenotipo fermentador de maltosa (*Mal*⁺).

Las cepas que mostraron las propiedades arriba citadas se seleccionaron del modo siguiente:

Los fenotipos *Mal* y *Ura* se determinaron por procedimientos estándar (Sherman, F.G.R. y otros, *A Laboratory course manual in yeast genetics [Manual de genética de levaduras para un curso de laboratorio]* (1986), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y).

El fenotipo *Iti* se analiza extendiendo una pequeña capa de células de levadura cultivadas durante la noche en una placa de YPD-agar (1% de extracto de levadura Bacto Difco, 2% de peptona Bacto Difco, 2% de glucosa, 2% de agar). La respuesta del cultivo se comprueba tras 2-3 semanas de incubación a 8°C.

Para combinar el fenotipo *Iti* con una estructura genética globalmente industrial se ha seleccionado una cepa que posee el siguiente genotipo *Iti* y se ha usado en los ensayos posteriores:

RD1483-2C-2: α/α *Its500/Its500 MAL4c/MAL4c URA3/URA3*

Esta cepa se combinó con segregados diploides de las siguientes cepas comerciales de levadura de panadería:

(1) LBB (Levure Boulangère Bleue, Le Saffre),

(2) Fermipan Standard (Gist Brocades),

cuyos segregantes diploides se han obtenido por esporulación y subsiguiente aislamiento de las ascosporas. Se escogieron los segregantes diploides que poseían un tipo sexual (que eran homocigóticos a/a) para cruzarlos con la cepa *Iti* diploide RD1483-2C-2.

El apareamiento de la cepa *Iti* arriba citada con las diferentes cepas industriales genéricas arriba mencionadas se efectuó del modo siguiente. Se extendieron cepas de tipo sexual opuesto sobre placas de YPD-agar y se incubaron a 30°C durante la noche. Una cantidad pequeña, pero igual, de cada cepa que debía aparearse se mezcló en una placa de YPD-agar y se incubó a 30°C durante 5 - 6 horas. Se controló la formación de cigotos bajo el microscopio. Luego se extrajeron los cigotos visualizados mediante un micromanipulador Leitz (Leitz, Alemania).

Así se pudieron aislar los siguientes segregados tetraploides:

1) Segregados a partir de LBB (Levure boulangère bleue, Lesaffre)

F-7	para dar el cigoto	RD83-7
F-24		RD83-24
F-28		RD83-28
FZ 15		FD1583
FZ 24		FD2483

2) Segregados a partir de Fermipan Standard (Gist Brocades)

FP5	para dar el cigoto	PD583
FP6		PD683
FP10		PD1083
FP20		PD2083

Ejemplo 2

Selección de cepas con características industriales

Para determinar el funcionamiento de una cepa en un proceso discontinuo alimentado se empleó un ensayo en el cual se midió el índice de crecimiento en cultivos aeróbicos en frascos agitados, utilizando etanol como fuente de carbono y acetato como sustancia inhibidora. La concentración de etanol se eligió a un nivel subtóxico de 0,7%, mientras que la concentración de acetato (en forma de ácido libre con el medio tamponado a pH 4,0) se optimizó de manera que la diferencia de índice de crecimiento entre una cepa de referencia con buen rendimiento (Levure Boulangère Bleue (LBB) de Le Saffre) y una cepa de referencia de bajo rendimiento (X2180, Yeast Genetic Stock Center, UC Berkeley) fuera máxima. En cada serie de experimentos están incluidas ambas cepas de referencia y el

rendimiento de las cepas ensayadas se expresa en porcentaje de índice de crecimiento respecto a la cepa industrial de buen rendimiento LBB.

5 Las células de la cepa estudiada se precultivan en un tubo de ensayo con 5 ml de YPD (1% p/v de extracto de levadura Bacto Difco, 2% p/v de peptona Bacto Difco, 2% p/v de glucosa) durante la noche a 30°C en un agitador giratorio a 190 rpm. De este cultivo se usa 1 ml para inocular un precultivo en frasco agitado (frascos Erlenmeyer de 500 ml con 4 deflectores en el fondo) con un volumen de 100 ml de medio NE (0,67% p/v de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos DIFCO, 1% p/v de succinato-Na₂, 1,12% v/v de HCl 5 M, 0,7% p/v de etanol (añadido tras el tratamiento en autoclave) y se continúa incubando durante 24 h a 30°C en un agitador giratorio a 190 rpm. Los
10 cultivos de ensayo finales (en frascos Erlenmeyer de 500 ml con 4 deflectores en el fondo) se iniciaron inoculando 100 ml de medio NEA (0,67% p/v de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos DIFCO, 1% p/v de succinato-Na₂, 1,12% v/v de HCl 5 M, 0,7% p/v de etanol, 0,3% p/v de ácido acético glacial (el etanol y el ácido acético se agregan después del tratamiento en autoclave) de manera que la DO₆₀₀ era de 0,1 aproximadamente. Se continuó incubando durante 10 h a 30°C y 190 rpm en un agitador giratorio y se midió la DO₆₀₀ a intervalos de 2 horas. Se
15 estableció el índice de crecimiento durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos. En comparación con la LBB (100%) el índice de crecimiento de las cepas depositadas ascendió a:

(LBB	100%)
FCL313	137%
CL14	165%
CL18	85%
(X2180	aprox. 30-40%)

Ejemplo 3

20 Selección de cepas con propiedades lti

Se cultivaron células en dos etapas de cultivo en frasco agitado. Una etapa comprendía un precultivo, en el cual se inocularon 0,1 ml de una suspensión celular congelada con glicerina a -80°C de cada cepa en 200 ml de medio YD (0,5% (p/v) de extracto de levadura Difco, 2% de glucosa) en frascos Erlenmeyer de 500 ml con cuatro deflectores de aireación y se incubó durante 72 horas a 180 rpm en un agitador giratorio a 30°C. Después se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 5000 rpm y a 4°C en una centrífuga Sorvall y se descartó el medio. El precipitado celular se resuspendió en 200 ml de medio mínimo (0,67% (p/v) de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos DIFCO, 1,00% de succinato-Na₂, 0,2% de sacarosa) y se prosiguió el cultivo durante 6 horas en frascos Erlenmeyer de 500 ml con cuatro deflectores de aireación a 30°C. Luego se agregó un 0,4% (p/v) de sacarosa (4 ml de solución de sacarosa al 20% esterilizada) y se continuó agitando por la noche a 180 rpm en un agitador giratorio a 30°C. Las células se lavaron tres veces con agua destilada helada y se centrifugaron cada vez a 5000 rpm.

35 Como modelo de masa se eligió una receta común de pizza con una harina relativamente fuerte.

Los ingredientes fueron los siguientes:

Ingrediente	Cantidad
Harina tipo "parisién"	120,4 g
Agua corriente	58,4 g
NaCl	2,8 g
Aceite de cacahuete	14,4 g
Suspensión de levadura en agua corriente al 15% de materia seca	4,0 ml
Total	200 g

40 La masa se preparó del modo siguiente. Se conservaron todos los ingredientes a 4°C y la masa se preparó en una estancia refrigerada (4°C). El aceite de cacahuete se licuó poniéndolo durante 30 minutos a temperatura ambiente. La suspensión de levadura se preparó pesando unos pocos gramos de torta de levadura (aprox. 30% de materia seca) en un tubo de polipropileno Falcon de 50 ml. Se añadió un volumen igual de agua corriente para obtener una suspensión con aprox. 15% de materia seca y se agitó vigorosamente. Se mezcló la harina con la sal y se agregó el aceite de cacahuete y el agua, y luego se añadieron a la mezcla 4 ml de la suspensión de levadura anteriormente preparada. Se amasó durante 4 minutos con una batidora plana para conseguir una masa suave, de la cual se cortaron piezas de 100 g que se transfirieron a un bote de vidrio para medirlas en el RISOGRAPH. Las mediciones se iniciaron inmediatamente después de sellar el bote.

50 Se midió el desarrollo de gas a 8°C a intervalos de 1 h durante un periodo de 120 horas. Se subió la temperatura a 12°C y se midió el desarrollo de gas a intervalos de 1 h durante un periodo de 100 a 120 horas. Se incrementó la temperatura hasta 30°C y se midió el desarrollo de gas a intervalos de 10 minutos durante un periodo de 6 – 17 h. El desarrollo de gas se calculó como la pendiente inicial de las curvas de gas a cada temperatura.

Los resultados de las mediciones a 30°C y a 8°C están representados en la fig. 1.

Ejemplo 4

Se preparó una masa modelo con los ingredientes y cantidades listados:

5

<i>Ingrediente</i>	<i>partes en peso</i>	<i>%</i>
Harina (Bruggmühle, tipo 400, Goldach, CH)	100	64,48
Sal (NaCl)	2,48	1,60
Etanol	1,63	1,05
Agua	50,74	32,74
Levadura, materia seca	0,23	0,15

10

La masa se dividió en alícuotas de 100 g y se introdujo en los recipientes del "Niesler" (que comercializa Biospectra AG, Schlieren (CH)), donde la composición de la masa se mantuvo durante un periodo de tiempo de 4 semanas a una temperatura de unos 8°C. Durante dicho periodo de tiempo se midió el desarrollo de CO₂. Los resultados de estas mediciones están representados en la fig. 1. Al hornear la masa preparada de esta forma después de 1, 2, 3, 4 o 5 semanas, el producto presentó una textura excelente y un sabor comparable al de los productos elaborados a partir de composiciones de masa recién preparadas.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para introducir una propiedad de una cepa de levadura, que está basada en un alelo recesivo, en la estructura genética de levaduras de panadería industrial, el cual comprende las etapas de
5 (a) seleccionar una levadura haploide que tenga una propiedad deseada basada en un alelo recesivo;
(b) diploidizar la levadura seleccionada en (a) y seleccionar un tipo sexual homocigótico;
(c) diploidizar una levadura de panadería industrial y seleccionar un tipo sexual homocigótico;
(d) aparear las cepas obtenidas en (b) y (c) que tengan un tipo sexual opuesto para obtener un cigoto tetraploide;
(e) esporular el cigoto obtenido en (d);
10 (f) seleccionar las cepas que muestren la propiedad deseada; y
(g) opcionalmente, aparear las cepas seleccionadas en (f) que tengan un tipo sexual opuesto.
2. El método según la reivindicación 1, en que la propiedad deseada está basada en (un) alelo(s) recesivo(s) de
15 un gen que mejora(n) el rendimiento de levadura de panadería industrial durante la producción de biomasa y/o la separación celular y/o el secado y/o durante la producción de masa leudada y/o el almacenamiento y/o el horneado.
3. El proceso según la reivindicación 2, en que el gen es un gen represor de catabolitos, un gen codificador de trehalasa neutra o ácida, un gen codificador de un enzima biosintético o un gen que en forma(s) alélica(s) confiere una propiedad lti.
20
4. El proceso según la reivindicación 3, en que la propiedad deseada es una propiedad lti.
5. Una levadura de panadería industrial que es FCL 313 depositada como NCIMB 41002.
- 25 6. La levadura de panadería según la reivindicación 5, que a temperaturas de refrigeración entre 3 y 12°C tiene una producción de CO₂ inferior a 3 ml/g de masa/por hora, preferiblemente inferior a 1 ml.
7. Composición de masa que contiene una levadura según la reivindicación 5 o 6.
- 30 8. Uso de una composición de masa según la reivindicación 7 para preparar productos horneados.
9. Producto horneado preparado con una composición de masa según la reivindicación 8.

Figura 1: índices iniciales de formación de CO₂ de cepas LTI cultivadas por el procedimiento de selección de masas

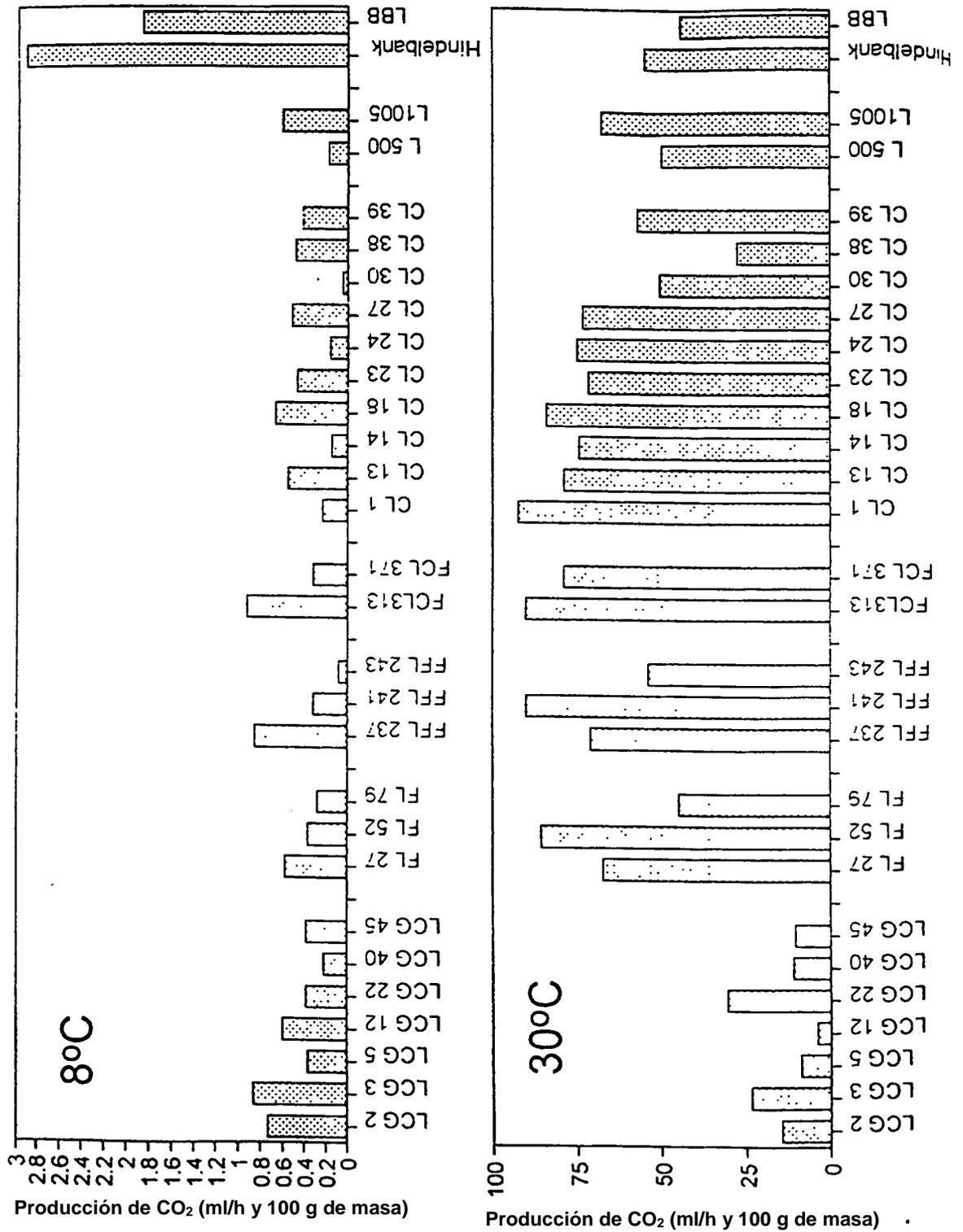


Figura 2: índices iniciales de formación de CO₂ de cepas LTI cultivadas por el procedimiento de carga alimentada

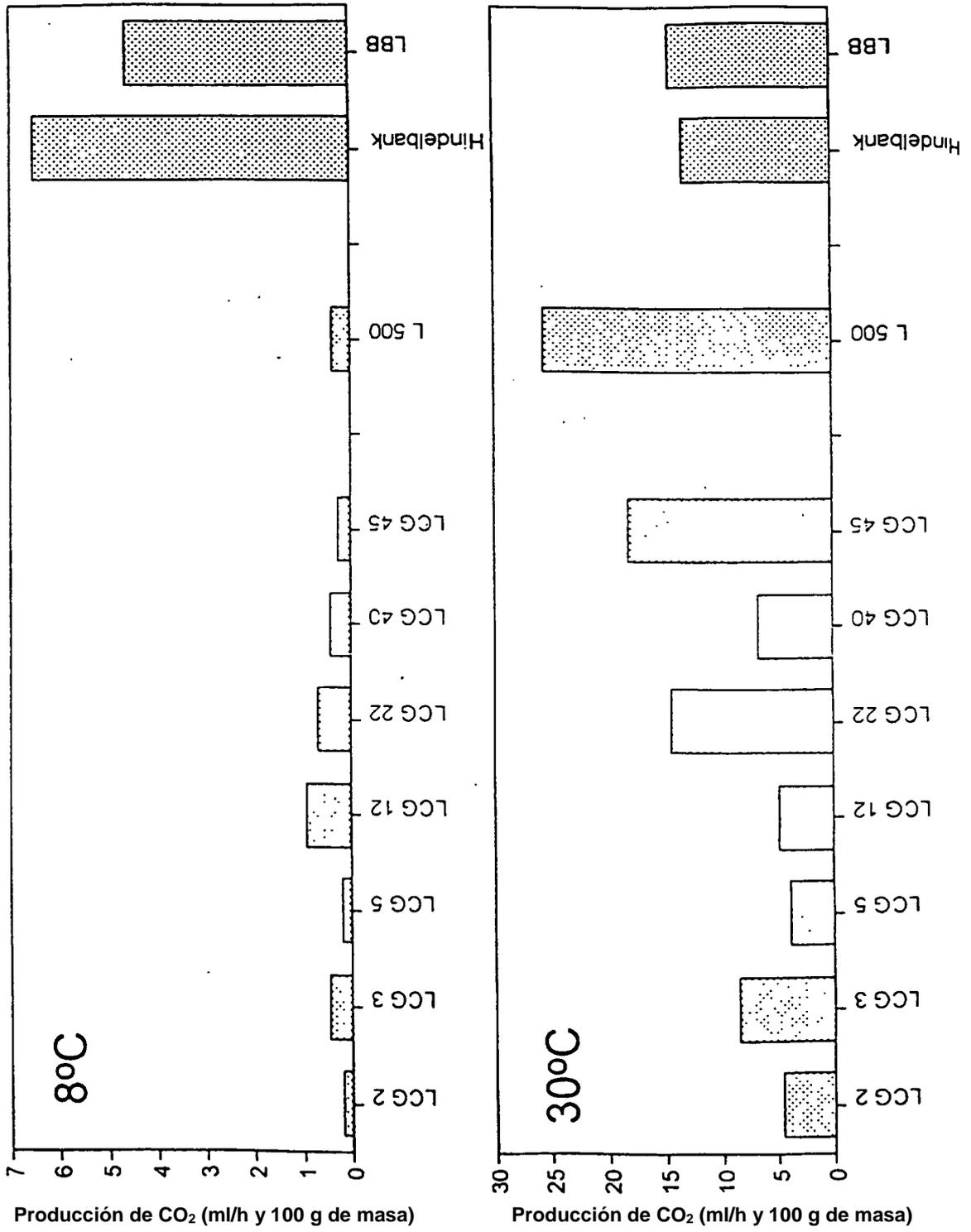


Figura 3: desarrollo de gas en masas por LCG2 en el método "activo"

