

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 111 495**

②① Número de solicitud: 9601614

⑤① Int. Cl.⁶: C12N 1/19, C12N 9/24

A21D 8/04, //(C12N 1/19

C12R 1:865), (C12N 9/24

C12R 1:66)

①②

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **19.07.96**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.98**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.03.98

⑦① Solicitante/s: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **Sanz Bigorra, Pascual;
Prieto Alamán, José Antonio;
Pérez González, José Antonio;
Ramón Vidal, Daniel y
Monfort Roig, Aurelia**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Cepa de levadura de panadería CECT10868 y cepa de panadería CECT10869. Su método de obtención por técnicas de ADN recombinante y su aplicación como levaduras de panadería.**

⑤⑦ Resumen:

Cepa de levadura de panadería CECT10868 y cepa de panadería CECT10869. Su método de obtención por técnicas de ADN recombinante y su aplicación como levaduras de panadería.

La presente invención consiste en la obtención de una cepa industrial de levadura de panadería capaz de expresar y exportar al exterior celular la enzima endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* y en la obtención de una cepa industrial de panadería capaz de expresar y exportar al exterior celular, conjuntamente, la enzima endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* y la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, con el fin de aumentar el proceso de degradación de las hemicelulosas y almidón presentes en la harina y, consecuentemente, mejorar el volumen, textura y vida media del pan elaborado. Para ello se han introducido en la levadura los genes correspondientes a estas enzimas y su expresión se ha regulado por un promotor típico de levadura, como es el del gen de la actina (*pACT1*), que es, además, funcional en las condiciones industriales de crecimiento en melazas. Su aplicación en técnicas de ingeniería genética y levadura de panadería.

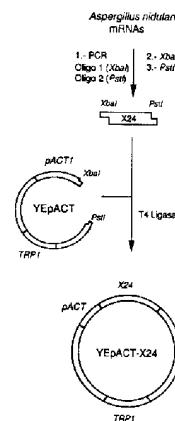


Fig. 1

ES 2 111 495 A1

DESCRIPCION

Cepa de levadura de panadería CECT10868 y cepa de panadería CECT10869. Su método de obtención por técnicas de ADN recombinante y su aplicación como levaduras de panadería.

5 **Campo de la técnica**

Técnicas de ingeniería genética (C12 N15).

Levadura de panadería.

10 **Indicación del estado de la técnica**

La utilización de enzimas implicadas en la biodegradación de hemicelulosas y de almidón es una de las áreas de mayor interés industrial. Cepas de levadura pertenecientes a diversos géneros, como por ejemplo *Saccharomyce cerevisiae*, son utilizadas en diferentes procesos industriales en los que existe una degradación parcial o total de diferentes tipos de hemicelulosas y almidones (elaboración de pan, vino, cerveza, etc.). Sin embargo, debido a que estas levaduras son incapaces de sintetizar enzimas que degraden hemicelulosa y/o almidón, la práctica usual consiste en la adición exógena de estos compuestos como aditivos alimentarios.

Así por ejemplo, la insuficiente actividad xilanásica y amilásica de la harina es contrarrestada en la práctica panadera, hasta el momento, mediante la adición de preparados xilanolíticos y/o amilolíticos parcialmente purificados [Pylar, E.J. (1988), en: Baking, Science and Technology, vol 1, pp. 132-183, Sosland Publishing Co., Merriem, Kansas; Pritchard, P.E. (1992), Journal Biological Education 26: 12-18; van Dam, H.W. y Hille, J.D.R. (1992), Cereals Food World 37:245-252; Kulp, K. (1993), en: Advances in Baking Technology, VCH Publishers Inc. New York].

Recientemente se ha caracterizado el sistema xilanolítico de *Aspergillus nidulans* [Fernández-Espinar, T. y col. (1992), FEMS Microbiology Letters 91:91-96; Fernández-Espinar, T. y col. (1993), FEMS Microbiology Letters 113:223-228; Piñaga, F. y col. (1994), FEMs Microbiology Letters 115:319323; Fernández Espinar, T. y col. (1994), Applied Microbiology Biotechnology 42:555-562; Fernández-Espinar, T. y col. (1996), Applied Microbiology Biotechnology 45:338-341]. Entre las xilanasas producidas por este hongo, la denominada xilanasas X24 tiene unas propiedades bioquímicas adecuadas para su utilización en el proceso de fermentación panaria. Se trata de una endoxilanasas cuyo pH y temperatura óptimas de actuación son compatibles con el citado proceso. El gen que codifica para esta enzima ha sido caracterizado y secuenciado [Pérez -González, J.A. y col. (1996), Applied Environmental Microbiology 62: (en prensa. vol. Junio)].

En la literatura existen ejemplos de la expresión de actividades xilanolíticas en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, pero en ningún caso se describe la expresión y utilización de la endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* por cepas industriales de levadura.

Recientemente, también se ha descrito la construcción de cepas de levadura de panadería capaces de expresar y exportar al exterior celular la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae* [Randez-Gil, F. y col. (1995), Journal Cereal Science 21: 1 85-1 93; Sanz, P. y col. (1 994), Patente Española n° 9402330, PCT/ES95/00102].

En la presente invención se obtienen cepas de levadura de panadería que expresan la enzima endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* y cepas de levadura de panadería que expresan conjuntamente la anterior enzima y además, la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae*. Con esta estrategia se consigue una normalización en la cantidad de las enzimas producidas, evita el aporte de componentes innecesarios y se reducen los problemas de Salud Laboral que plantea el uso de los preparados enzimáticos en forma de polvo.

55 **Breve descripción de la invención**

La presente invención consiste en la obtención de una cepa industrial de levadura de panadería capaz de expresar y exportar al exterior celular la enzima endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* y en la obtención de una cepa industrial conjuntamente, la enzima endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* y la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, con el fin de aumentar el proceso de degradación de las hemicelulosas y almidón presentes en la harina y, consecuentemente, mejorar el volumen, textura y vida media del pan elaborado. Para ello se han introducido en la levadura los genes correspondientes a estas

enzimas y su expresión se ha regulado por un promotor típico de levadura, como es el del gel de la actina (*pACT1*), que es, además, funcional en las condiciones industriales de crecimiento en melazas.

Descripción detallada de la invención

5

El cDNA correspondiente a la endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* se obtuvo como se describe en Pérez-González y col. [(1996), Applied Environmental Microbiology 62:(en prensa, vol. Junio)]. Este cDNA se puso bajo el control del promotor *pACT1* en un plásmido episomal que llevaba el gen *TRP1* como marcador de selección (YE ρ ACT-X24). La construcción del plásmido YE ρ ACT-AMY que contiene el

10

cDNA correspondiente a la enzima α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, bajo el control del promotor *pACT1*, ya se ha descrito con anterioridad [Randez-Gil, F. y col. (1995), Journal Cereal Science 21:185-193; Sanz, P. y col. (1994), Patente Española n° 9402330, PCT/ES95/00102]. La construcción (pACT1-X24) se introdujo apropiadamente en el plásmido YE ρ ACT-AMY al lado de la construcción (pACT1-AMY), obteniéndose el plásmido YE ρ ACT-AMY-ACT-X24.

15

Los plásmidos YE ρ ACT-X24 y YE ρ ACT-AMY-ACT-X24 se introdujeron en la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* 10a12-13x28b4 (*trp1*) (CECT 10837), siguiendo el procedimiento del acetato de litio [Ito, H. y col. (1983), Journal Bacteriology 153:163-168], seleccionándose los transformantes por crecimiento en medio mínimo.

20

Descripción de los dibujos

La figura 1 describe la construcción del plásmido YE ρ ACT-X24. Los plásmidos están representados esquemáticamente y no a escala.

25

La figura 2 describe la construcción del plásmido YE ρ ACT-AMY-ACTX24.

La figura 3 muestra la producción de las enzimas endoxilanasas X24 y α -amilasa por diferentes transformantes cuando se crecen en medio con melazas.

30

La figura 4 muestra las curvas de firmeza de panes elaborados con diferentes levaduras a lo largo de 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C.

Un modo de realizar la invención

35

1.- Construcción del plásmido YE ρ ACT-X24

40

El cDNA correspondiente a la endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* ha sido caracterizado y secuenciado con anterioridad [Pérez-González, J.A. y col. (1996), Applied Environmental Microbiology 62:(en prensa, vol. Junio)].

45

Este cDNA se obtuvo por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de mRNAs de *Aspergillus nidulans* crecido en condiciones de inducción (xilano de avena como única fuente de carbono), utilizando oligonucleótidos sintéticos especialmente diseñados para este fin. Estos oligos fueron:

oligo 1 5' CCTCTAGACGTCAACAACCGGCAACATGG3' (sitio XbaI)

oligo 2 5' CGGTGCGACTGCAGAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT3' (sitios *Pst*ly *Hind*III)

50

El cDNA se subclonó en el plásmido YE ρ ACT(TRP1), que contiene el promotor de la actina *pACT1* y el gen *TRP1* como marcador de selección, resultando el plásmido YE ρ ACT-X24, en el que la expresión de la endoxilanasas X24 está controlada por el promotor *pACT1* (Figura 1).

55

2.- Construcción del plásmido YE ρ ACT-AMY

La construcción de este plásmido se realizó como se describe en Randez-Gil, F. y col. (1995), Journal Cereal Science 21:185-193.

60

3.- Construcción del plásmido YE ρ ACT-AMY-ACT-X24

A fin de obtener una expresión conjunta de la endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans* y la α -

amilasa de *Aspergillus oryze*, se construyó el plásmido YEpACT-AMY-ACT-X24 (Figura 2). Para ello, el plásmido YEpACTX24 se dirigió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI*. El fragmento resultante, que contenía la construcción (pACT1-X24) se subclonó en el plásmido pBlue-Script digerido previamente con los mismos enzimas, resultando el plásmido pBS-ACT-X24. Este plásmido se digirió entonces con la enzima *HindIII*, liberándose un fragmento similar al anterior pero flanqueado por extremos cohesivos *HindIII*.

El plásmido YEpACT-AMY se dirigió con la enzima *HindIII* y se utilizó para albergar el fragmento (pACT-X24) descrito en el párrafo anterior. De las dos orientaciones posibles, se seleccionó la (pACT-AMY-pACT-X24), pues fue la más eficiente en cuanto a la producción de las dos enzimas se refiere. El plásmido resultante se denominó YEpACT-AMY-ACT-X24.

4.- Transformación

La levadura industrial CECT 10837 [*Saccharomyces cerevisiae* 10a1213x28b4 (Randez-Gil, F. y Sanz, P. 1994, Applied Microbiology biotechnology 42:581-986)] se transformó con los plásmidos YEpACT-X24 y YEpACT-AMYACT-X24, siguiendo el procedimiento del acetato de etilo [Ito, H. y col. (1983), Journal Bacteriology 153:163-168], seleccionándose los transformantes por crecimiento en medio mínimo. Los transformantes contenido estos plásmidos se encuentran depositados con fechas 30-Mayo-1996 en la Colección Española de Cultivos Tipo con los número CECT10868 y CECT10869 respectivamente.

5.- Producción de endoxilanas X24 y α -amilasa por los transformantes

Los transformantes obtenidos se crecieron en medio de cultivo industrial a base de melazas de remolacha, siguiéndose el aumento de biomasa (absorbancia a 600 nm) y la aparición de las actividades endoxilanas y α -amilasa en el medio de cultivo. En la Figura 3 se muestra la producción de estas dos enzimas por parte de los transformantes ensayados [YEpACT-X24], [YEpACT-AMY] y [YEpACT-AMY-ACT-X24]. La determinación de la actividad xilanásica se llevó a cabo midiendo la liberación de azúcares reductores resultantes de la acción de la enzima sobre silano de avena. Los azúcares reductores se determinaron por el método del dinitrosalicílico (DNS) [Bailey y col. (1992), Journal Biotechnology 23:257-270]; una unidad se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de azúcares reductores por minuto a 50°C en las condiciones del ensayo. La determinación de la actividad amilásica se llevó a cabo utilizando el método ceralpha, que usa pnitrofenilmal -toheptaósido como sustrato [Sheenan, H. y McCleary, B.V. (1988), Biotechnology Techniques 2:289-292]; una unidad ceralpha se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto a 42°C, en las condiciones del ensayo.

El transformante [YEpACT-AMY-ACT-X24] fue capaz de secretar cantidades de α -amilasa similares a las del transformante [YEpACT-AMY], pero los niveles de endoxilanas X24 fueron inferiores a los del transformante [YEpACT-X24] (Figura 3).

6.- Ensayos tecnológicos

Se elaboraron panes por el procedimiento del amasado directo incluyendo un 2% de las correspondientes levaduras. En la Tabla 1 se muestra el volumen y la densidad de los panes obtenidos. Como se observa, el transformante [YEpACT-AMY-ACT-X24] es capaz de producir un pan con un volumen superior (30%) que el obtenido con una levadura comercial control.

TABLA 1

Volumen y densidad de los panes elaborados por el procedimiento de amasado directo, utilizando diferentes levaduras

Cepa	Volumen (ml)	Densidad (g/ml)
Levadura Comercial	290.0 \pm 17.3	0.331 \pm 0.016
[YEpACT-X24]	307.4 \pm 10.1	0.311 \pm 0.004
[YEpACT-AMY]	285.0 \pm 27.2	0.330 \pm 0.013
[YEpACT-AMY-ACT-X24]	382.9 \pm 11.3	0.230 \pm 0.010

ES 2 111 495 A1

Los panes obtenidos se almacenaron a temperatura ambiente 0 a 4°C, y en diferentes días, se midió la textura en rebanadas de 2 cm de grosor, utilizando una prensa Instron 1140 (Instron Food Testing Machine, USA). Se registraron los valores de tres rebanadas centrales por muestra y se midió la fuerza requerida para comprimir 3/4 partes de cada pieza. En la Figura 4 se muestra la evolución de la textura observada para los panes elaborados con una levadura comercial control, y los transformantes [YE_pACT-X24], [YE_pACTAMY] y [YE_pACT-AMY-ACT-X24] respectivamente. Los panes elaborados con el transformante [YE_pACT-AMY-ACT-X24] mostraron una menor textura en todos los tiempos ensayados, tanto en panes almacenados a temperatura ambiente como a 4°C.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Levaduras de panaderías, **caracterizadas** por su número de identificación, **Saccharomyces cerevisiae 10a12-13x28b4** [YE_pACT-X24] y [YE_pACT-AMYACT-X24] y sus números de orden
5 CECT10868 y CECT10869 respectivamente, atribuidos por la Autoridad Internacional de Depósitos, Colección Española de Cultivos Tipo.

2. Método de obtención de las levaduras de panadería identificadas según la reivindicación 1, **caracterizado** por la expresión de la secuencia de cDNA que contenga el gen del hongo *Aspergillus nidulans* que
10 codifica una actividad endoxilanolítica del tipo X24 y la expresión conjunta de la actividad anterior y la actividad $\alpha(1-4)$ amilásica del hongo *Aspergillus oryzae*, en cepas de levadura industrial, preferentemente en la cepa de levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* 10a12-13x28b4 (CECT 10837).

3. Aplicación en la producción de pan y de productos de panadería de las levaduras industriales
15 según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque se realiza por el inóculo de cepas CECT10868 y/o CECT10869 recombinantes que expresen la proteína endoxilanasas X24 de *Aspergillus nidulans*, sola o en combinación con la proteína $\alpha(1-4)$ amilasa de *Aspergillus oryzae*, o por el inóculo de otras cepas recombinantes que expresen enzimas capaces de degradar hemicelulosas y/o almidón, preferentemente endoxilanasas y α -amilasas de forma que contribuyan a mejorar el volumen, la textura y el tiempo de
20 vida media del pan u otros productos de panadería.

25

30

35

40

45

50

55

60

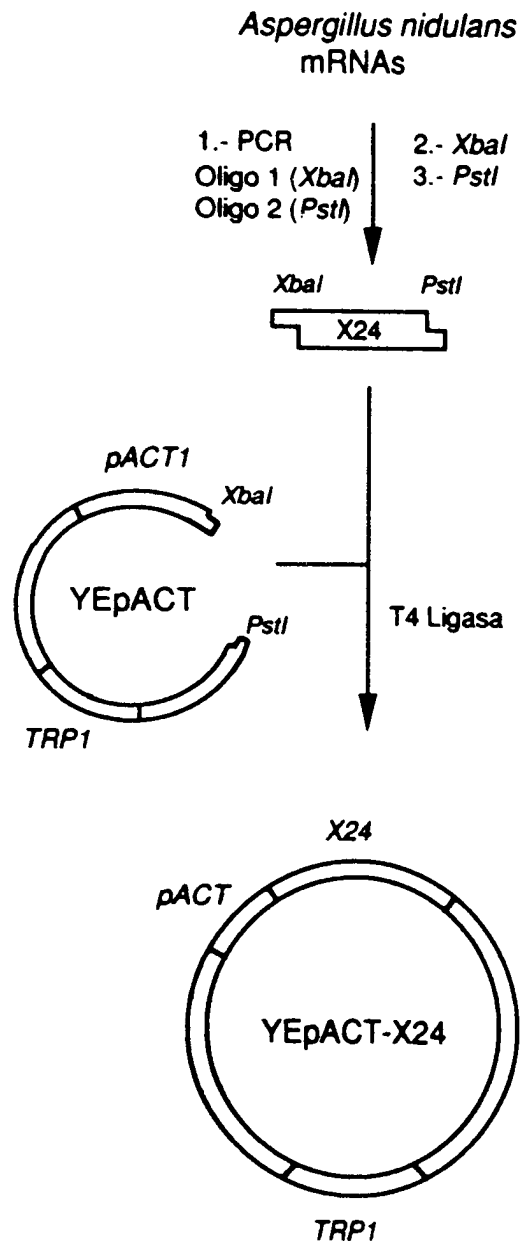


Fig. 1

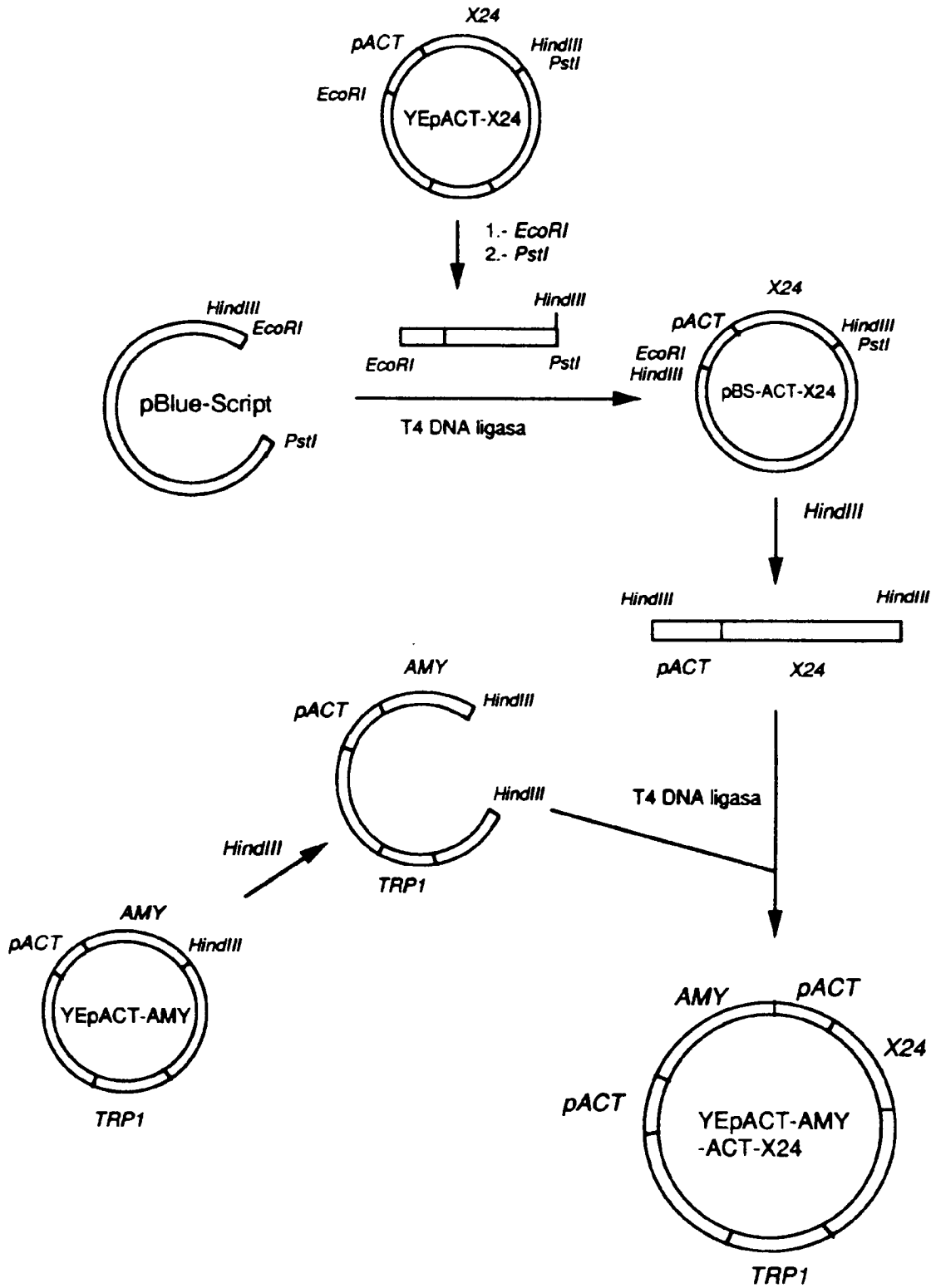


Fig. 2

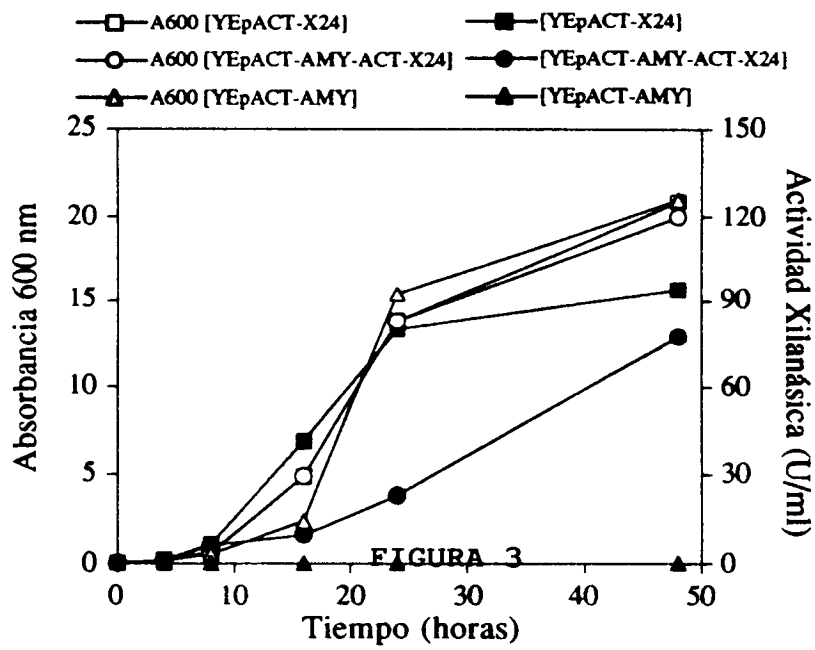
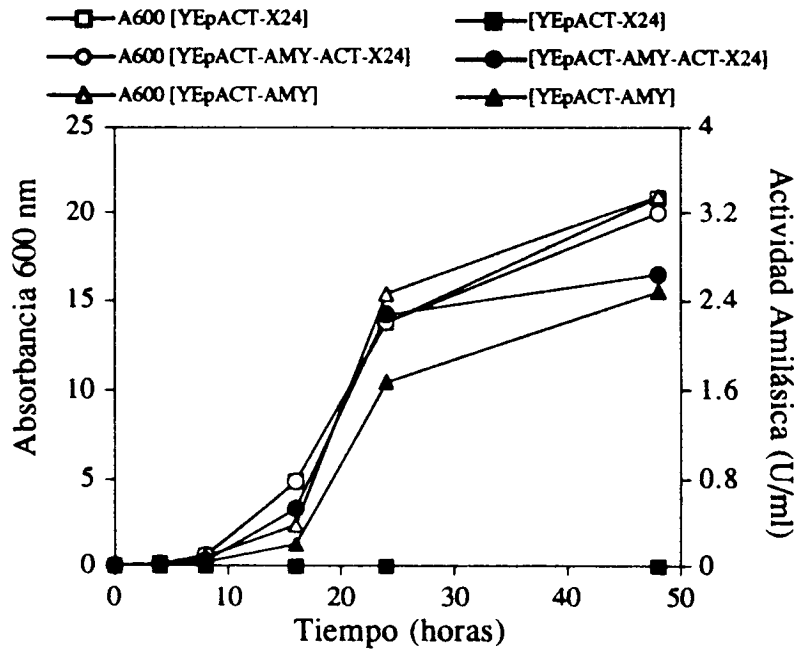


FIGURA 3

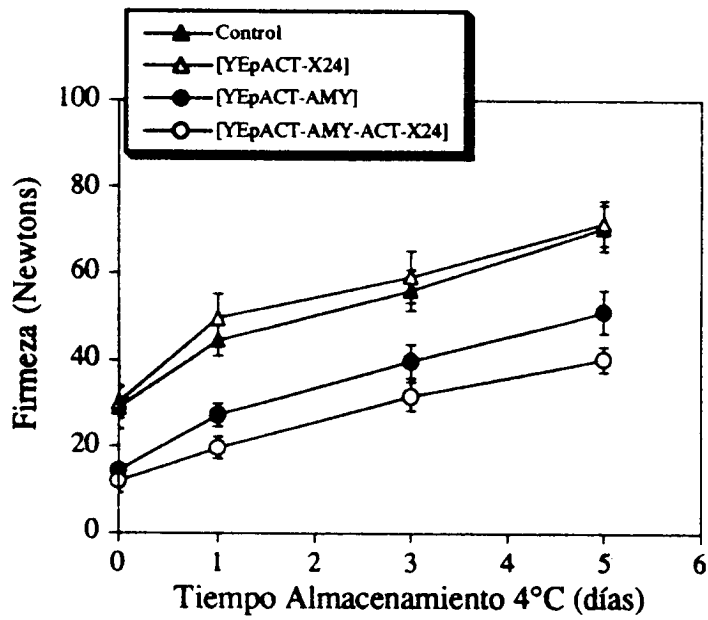
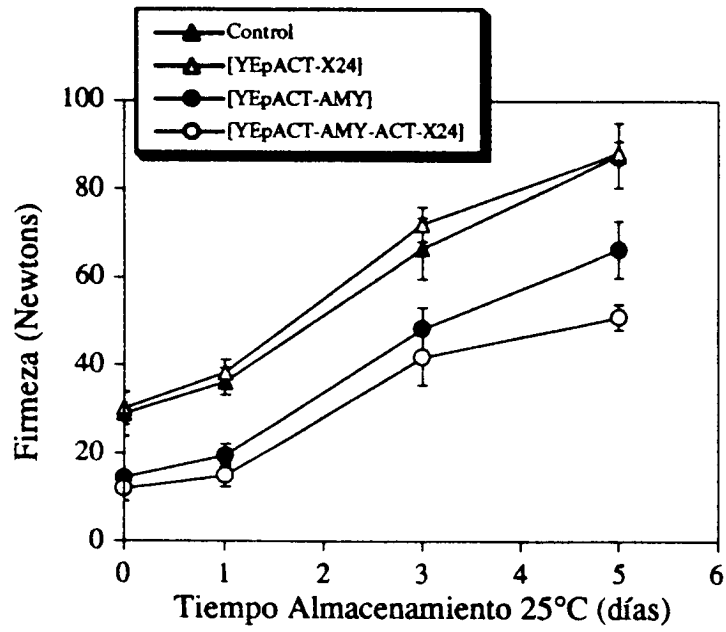


FIGURA 4



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 1/19, 9/24, A21D 8/04 // (C12N 1/19, C12R 1:865), (C12N 9/24, C12R 1:66)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PEREZ-GONZALEZ, J.A. et al. "Molecular cloning and expression in Saccharomyces cerevisiae of two Aspergillus nidulans xylanase genes", APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY, 1996, Vol. 62, N° 6, páginas 2179-2182 * Todo el documento *	1,3
Y	* Todo el documento *	1-3
X	FERNANDEZ-ESPINAR, M.T. et al. "Construction of an Aspergillus nidulans multicopy transformant for the xlnB gene and its use in purifying the minor X24 xylanase", APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY, 1996, Vol. 45, páginas 338-341 * Todo el documento *	1,3
X	EP-0463706-A (GIST-BROCADES N.V.) 02.01.92 * Página 4, línea 41 - página 9, línea 29; ejemplos 6,9; reivindicaciones 1-13,18 *	1-3
X	WO-9414965-A (GIST-BROCADES N.V.) 07.07.94 * Página 6, línea 10 - página 11, línea 37; página 13, línea 34 - página 16, línea 3; ejemplos; reivindicaciones 1-8 *	1-3
X	WO-9119782-A (UNILEVER) 26.12.91 * Todo el documento *	1-3
X	WO-9421785-A (NOVO NORDISK A/S) 29.09.94 * Página 6, línea 31 - página 9, línea 35; página 13, líneas 11-26 *	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

03.02.98

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 1/19, 9/24, A21D 8/04 // (C12N 1/19, C12R 1:865), (C12N 9/24, C12R 1:66)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	RANDEZ-GIL, F. et al. "Construction of baker's yeast strains that secrete Aspergillus oryzae alpha-amylase and their use in bread making", JOURNAL OF CEREAL SCIENCE, 1995, Vol. 21, páginas 185-193 * Todo el documento *	1-3
A	PIÑAGA, F. et al. "Xylanase production in Aspergillus nidulans: Induction and carbon catabolite repression", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, Vol. 115, páginas 319-324 * Todo el documento *	1-3
A	FERNANDEZ-ESPINAR, M.T. et al. "Xylanase production by Aspergillus nidulans", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1992, Vol. 91, páginas 91-96 * Todo el documento *	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

03.02.98

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/2