

**DESARROLLO DE UNA LEVADURA REDUCTORA DE LA
ASPARAGINA MEDIANTE EVOLUCIÓN ADAPTATIVA Y USOS DE
LA MISMA PARA REDUCIR LA FORMACIÓN DE ACRILAMIDA**

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de E.U. No. 62/189,547, presentada el 7 de julio de 2015, los contenidos de la cual se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

La invención se refiere a productos y métodos para reducir la concentración de acrilamida en los alimentos así como también a productos alimenticios que tienen un contenido reducido de acrilamida. En particular, la invención se refiere a cepas de levadura evolucionadas que tienen mayor capacidad para reducir la asparagina y, en consecuencia, la acrilamida.

Antecedentes de la invención

La acrilamida (AA) es una sustancia química industrial usado para preparar polímeros de poliacrilamidas usados en el tratamiento de aguas residuales, la elaboración de papel, el procesamiento de minerales, la recuperación de aceites, la investigación científica, y el procesamiento de colorantes/telas. A pesar de su uso generalizado, la AA es altamente tóxica para los sistemas biológicos, como lo evidencia la gran cantidad de estudios en modelos en animales (ratas y ratones) in vitro e in vivo (1-6). Tomados en conjunto, estos datos establecen

de manera contundente a la AA -y su metabolito activo glicidamida- como sustancia química tóxica con un fuerte potencial mutagénico, citotóxico y neurotóxico.

Como resultado de su toxicidad demostrada en los sistemas no humanos, la AA fue clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (WHO-IARC por sus siglas en inglés) en el año 1994 como carcinógeno perteneciente al Grupo 2A (los compuestos de este grupo se enuncian como “probablemente carcinogénicos para los humanos” sobre la base de la “evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales experimentales y fuerte evidencia de que la carcinogénesis es mediada por un mecanismo que también opera en los seres humanos”).

En el año 2002, se mostró que la AA aparece en una variedad de productos alimenticios comunes de consumo humano, como resultado de las reacciones de oscurecimiento de Maillard que tienen lugar durante la cocción (7-9). Más específicamente, la AA se forma rápidamente cuando el aminoácido asparagina reacciona con azúcares reductores en alimentos o productos alimenticios almidonados una vez que se exponen a temperaturas iguales o superiores a 120 °C (por ejemplo, fritura, horneado, asado, etc.). Por lo tanto, la AA se encuentra en cantidades significativas en una amplia variedad de productos alimenticios, que incluyen panes (de todo tipo de harinas), papas, productos a base de papa (papas fritas, papas de copetín, hojuelas de papa y harinas), café, cereales, verduras, etc. (10-19).

Como resultado de su ubicuidad en los productos alimenticios, la exposición de la dieta humana a la AA es generalizada. No obstante, en la actualidad no existe consenso científico en cuanto al rol directo que desempeña la AA de la dieta en causar cáncer en humanos. Si bien se han completado más de 30 estudios epidemiológicos hasta la fecha (20), muchos de estos estudios alcanzan conclusiones inconsistentes o confusas, por lo que solamente sustentan una relación correlativa entre la alta exposición de AA en la dieta y una variedad de cánceres, especialmente renales, endometriales y ováricos (20).

A pesar de la falta de consenso científico respecto del rol de la AA de la dieta en causar cáncer, muchos gobiernos y organismos reglamentarios en el mundo han hecho de la evaluación y mitigación de los riesgos de la AA de la dieta una prioridad significativa. De hecho, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés), la OMS, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, la Oficina de Evaluación de Riesgos a la Salud Ambiental (OEHHA, por sus siglas en inglés) de California y el Departamento de Salud del Gobierno de Canadá (Health Canada) coinciden en considerar que la presencia de AA en los alimentos es un tema de gran preocupación y recomiendan reducir los niveles de AA en alimentos y bebidas a un nivel lo más bajo que se pueda alcanzar en forma razonable (ALARA, As Low As Reasonably Achievable por sus siglas en inglés). Asimismo, tanto la EFSA (Acrylamide Toolbox—

http://www.fooddrinkeurope.eu/publications/category/toolkits/) como la FDA (<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm2006782.htm>) publican documentos de asesoramiento centrados en la industria para reducir la AA en alimentos y bebidas.

Los métodos actualmente disponibles para la reducción de la AA se basan en dos principios básicos: 1) la mitigación de la formación de AA mediante prácticas de procesamiento de alimentos (limitando el tiempo y la temperatura de cocción), y 2) la eliminación de la asparagina como el precursor de AA. Es importante destacar que solamente la segunda estrategia reduce el potencial de formación de la AA de los alimentos, ya que la AA se puede formar durante las prácticas de cocción de los consumidores finales. Tanto en los alimentos producidos comercialmente como en los alimentos preparados en el hogar, el contenido de AA se incrementa de manera significativa con el tiempo y la temperatura de cocción (21). Por lo tanto, los métodos de reducción de la AA basados en la eliminación de la asparagina se consideran superiores ya que eliminan el potencial de formación de la AA en las últimas etapas del proceso.

En la actualidad existen numerosos métodos para disminuir el contenido de AA de los alimentos. Estos métodos incluyen preparaciones de la enzima Asparaginasa (Acrylaway®, Novozymes, Dinamarca, y PreventASe, DSM, Holanda) (<http://www.acrylaway.com/en/Pages/default.aspx>; http://www.dsm.com/markets/foodandbebidas/en_US/products/enzym

es/baking/preventase.html), fermentación extensa de la levadura (22), aplicación de glicina a la masa o bollo antes de la fermentación (23, 24), inmersión de las papas en cloruro de calcio antes de freírlas (25), reemplazo de los azúcares reductores por sacarosa (26), optimización
5 general de las condiciones de procesamiento, tales como temperatura, pH y contenido de agua (25, 27, 28), estudios relacionados con diferentes elecciones de materias primas (27), y fermentación con bacterias del ácido láctico (Zerabac y Zeracid, Zeracryl, Noruega; <http://www.zeracryl.com/>). Asimismo, recientemente se ha descrito
10 una variedad de papa baja en asparagina (29-31); sin embargo, fue creada mediante tecnología de ADN recombinante y, por lo tanto, se la considera un organismo genéticamente modificado (GMO, por sus siglas en inglés) (<http://www.simplotplantsciences.com/>). Todos estos enfoques mencionados son inadecuados hasta cierto punto, o
15 presentan problemas inherentes que no los hacen prácticos durante la fabricación de los productos alimenticios, incluyendo costos, efectos sobre las propiedades organolépticas del alimento y/o reducción ineficaz de la acrilamida bajo condiciones de procesamiento de alimentos a escala industrial.

20 La levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) es naturalmente capaz de consumir/degradar los precursores de la AA, la asparagina y los azúcares reductores. Sin embargo, bajo la mayoría de las condiciones comunes al procesamiento de alimentos, la maquinaria celular necesaria para degradar la asparagina se apaga.
25 Por ende, a menos que se usen con condiciones y tiempos muy

específicos, las cepas de levadura convencionales son ineficaces para reducir la AA. Para enfrentar este problema, los presentes inventores previamente desarrollaron una tecnología basada en levadura de panadería genéticamente modificada (GMO) novedosa para reducir los niveles de acrilamida en los alimentos (Solicitud de Patente US 2012/0321744 A1). Esta tecnología consiste en una cepa específica de *S. cerevisiae* -diseñada mediante tecnología de ADN recombinante- para degradar la asparagina y, de este modo, la acrilamida. Aunque la cepa de levadura descrita en esta publicación de solicitud de patente US No. 2012/0321744 A1 es efectiva para reducir la acrilamida en una amplia variedad de alimentos, el uso de tecnología de ADN recombinante en su desarrollo clasifica la cepa como un organismo genéticamente modificado (GMO) auto-clonado. Esta designación inherentemente limita su adopción en las industrias y en los países en donde los productos GMO son vistos de manera negativa y/o están en contra de las legislaciones.

En *S. cerevisiae*, los genes responsables de la degradación de la asparagina son *ASP1* y *ASP3*, que codifican una Asparaginasa I intracelular y una Asparaginasa II asociada a la pared celular extracelular, respectivamente (32-34). El *ASP1* existe como un gen de copia única (35), mientras que el *ASP3* existe como un locus de repetición en tándem cuádruple (36). De manera interesante, el locus *ASP3* no es nativo a *S. cerevisiae*, sino que fue adquirido a través de evolución mediante transferencia génica horizontal de una especie de levadura distinta de *Saccharomyces* (*Wickerhamomyces*) (34).

Es bien sabido que el *ASP1* es expresado en forma constitutiva, pero es predominantemente responsable de la utilización intracelular de la asparagina, en lugar del barrido extracelular de la asparagina para el nitrógeno (32, 33). Como tal, la actividad del *ASP1* por sí sola no es suficiente para que la levadura degrade cantidades significativas de asparagina a los efectos de reducir la AA en los alimentos. Para degradar la asparagina extracelular, la levadura debe expresar Asparaginasa II; sin embargo, el *ASP3* está sujeto a mecanismos que controlan selectivamente la utilización del nitrógeno en la levadura, lo que se conoce más comúnmente como “represión por catabolito del nitrógeno” (NCR, por sus siglas en inglés) (37-41). En general, la “NCR” hace referencia a los mecanismos moleculares (que consisten en sistemas de detección y circuitos reguladores de transcripción) que permiten la expresión génica diferencial de permeasas y enzimas catabólicas necesarias para degradar las fuentes de nitrógeno. Más específicamente, en los cultivos desarrollados en múltiples fuentes de nitrógeno, la NCR permite que la levadura catabolice secuencialmente diferentes fuentes de nitrógeno, sobre la base de su relativa jerarquía de utilización bioquímica (32, 42). En el contexto del *ASP3*, se sabe que, al igual que otros genes regulados por NCR, la enzima puede ser inducida durante el cultivo en condiciones de nitrógeno pobre o deficiente (independientemente del tipo de fuente de nitrógeno) siempre que las reservas de aminoácidos intracelulares se agoten a un nivel por debajo del umbral (36, 37, 39, 40).

La mutagénesis aleatoria y evolución adaptativa se refiere a la adaptación sucesiva o iterativa de un organismo a condiciones y/o ámbitos de cultivo novedosos. Para lograr esto, se introducen mutaciones aleatorias en un organismo, seguido de la caracterización de la gran reserva de variantes, y la selección de individuos con rasgos deseados. De esta manera, la selección artificial se usa para identificar variabilidad genética deseable acelerada a través de mutagénesis (43). La técnica se usa comúnmente en microbiología para impartir o reforzar rasgos deseables en microbios industrialmente relevantes y, más específicamente, su uso es de larga data en la industria alimenticia (43-56). De manera importante, la evolución adaptativa no implica el uso de tecnología de ADN recombinante; por consiguiente, los organismos creados por evolución adaptativa son organismos no GMO (http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/new/index_en.htm) y, como tales, no están sujetos a cuestiones relacionadas con leyes restrictivas de alimentos vinculados a organismos GMO ni con cuestiones que atañen a la aceptación de los consumidores.

En virtud de su naturaleza, la evolución adaptativa siempre selecciona la manera óptima de lograr una tarea (52). A través de grandes poblaciones y a lo largo de muchas generaciones, la mutación aleatoria permite que la evolución “pruebe” toda solución posible a un problema. Solamente aquellas soluciones que incrementen la aptitud o eficacia (*fitness*) -o que por lo menos no sean abiertamente perjudiciales- sobrevivirán a la próxima generación (52). Este

concepto adquiere especial importancia cuando se considera que las adaptaciones a un nicho ecológico generalmente pagan un costo a nivel aptitud cuando se encuentran fuera de ese ambiente (52). Como tal, la evolución adaptativa permite que los organismos alcancen un equilibrio de aptitud con su ambiente. Este equilibrio está formado por mutaciones causativas para una adaptación de interés, así como también por mutaciones compensatorias que contrarrestan la pérdida de aptitud generalizada lo más posible. De este modo, los mecanismos adaptativamente evolucionados con frecuencia pueden ser superiores a los métodos específicos y dirigidos tales como ingeniería de ADN recombinante.

Como sucede con otros microorganismos, la levadura de panadería es altamente proclive a la mutagénesis aleatoria y evolución adaptativa. De hecho, la técnica ha sido usada ampliamente para modificar rasgos relevantes a los procesos industriales, tales como la elaboración de vinos y la producción de bioetanol (56). La evolución adaptativa también ha sido empleada para estudiar la respuesta de adaptación a los ambientes con nitrógeno limitado (57, 58) y, más específicamente, modificar la capacidad de la levadura para usar nitrógeno (desregulación de NCR) para el tratamiento de aguas residuales (59). Además, se ha utilizado mutagénesis aleatoria y selección de una sola ronda para aislar mutantes de levadura de laboratorio con *ASP3* desreprimido a fin de estudiar los mecanismos de regulación de *ASP3* mediada por NCR (60).

Breve descripción de la invención

Los presentes inventores han demostrado que, usando un método particular de evolución adaptativa iterativa, es posible aislar una cepa de levadura novedosa que tiene actividad reductora de la asparagina bajo condiciones no inductoras.

5 Por consiguiente, la invención provee un método para aislar una cepa de levadura que degrada L-asparagina bajo condiciones no inductoras, en donde el método comprende los siguientes pasos:

 a) subcultivar una cepa de levadura de tipo natural, la cual expresa o tiene la capacidad de expresar una asparaginasa asociada
10 a la pared celular, en presencia de medios que contienen D-asparagina como la única fuente de nitrógeno;

 b) subcultivar en forma continua, realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento, y someter a mutagénesis en forma semanal;

 c) seleccionar los cultivos del paso b) cuando la tasa de
15 crecimiento alcanza el valor inicial;

 d) subcultivar en forma continua las células seleccionadas en los medios selectivos que contienen metilamina, realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento, y mutagenizar en forma semanal hasta que la tasa de crecimiento en presencia de metilamina alcanza la
20 correspondiente a los medios selectivos sin metilamina;

 e) aislar las colonias individuales del paso d) mediante plaqueo sobre medios selectivos que contienen metilamina, cultivar dichas colonias, y seleccionar las colonias grandes y de rápido crecimiento;

 f) evaluar las colonias seleccionadas del paso e) en cuanto a su
25 capacidad para degradar L-asparagina bajo condiciones no

inductoras, y seleccionar al menos una colonia con actividad de degradación de L-asparagina alta, en comparación con las células al inicio del paso d);

g) repetir los pasos d) a f) con las células seleccionadas del paso f), incrementando la concentración de metilamina cada vez que se repiten, hasta que la actividad de degradación de L-asparagina alcanza una meseta;

h) aislar la cepa del paso g) en el cual la actividad de degradación de L-asparagina ha alcanzado una meseta.

En una forma de realización, la asparaginasa asociada a la pared celular es codificada por el locus *ASP3*.

En una forma de realización, la cepa de levadura de tipo natural o silvestre (WT, por sus siglas en inglés) es una cepa de levadura industrial. En una forma de realización, la cepa de levadura es una cepa de levadura de panadería industrial.

Las cepas de levadura pueden incluir, sin limitaciones, géneros y especies del reino de los hongos. En una forma de realización, los géneros y las especies se pueden seleccionar entre los usados en la producción de alimentos. En otra forma de realización, las especies son, sin limitaciones, las siguientes: *Aspergillus acidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Candida etchellsii*, *Candida milleri*, *Candida oleophila*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida versatilis*, *Candida zemplinina*, *Candida zeylanoides*, *Cyberlindnera jadinii*, *Cyberlindnera mrakii*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera*

bruxellensis, *Fusarium domesticum*, *Fusarium venenatum*,
Galactomyces candidum, *Geotrichum candidum*, *Guehomyces*
pullulans, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora osmophila*,
Hanseniaspora uvarum, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania unispora*,
5 *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lachancea*
fermentati, *Lachancea thermotolerans*, *Lecanicillium lecanii*,
Metschnikowia pulcherrima, *Mucor hiemalis*, *Mucor mucedo*, *Mucor*
plumbeus, *Mucor racemosus*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium*
camemberti, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium chrysogenum*,
10 *Penicillium commune*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium roqueforti*,
Penicillium solitum, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia*
kudriavzevii, *Pichia membranifaciens*, *Pichia occidentalis*, *Pichia*
pijperi, *Rhizopus microspores*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus*
oryzae, *Rhizopus stolonifer*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces*
15 *cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces vanrijiae*,
Scopulariopsis flava, *Starmerella bombicola*, *Torulaspora delbrueckii*,
Torulopsis candida, *Torulopsis holmii*, *Trigonopsis cantarellii*,
Wickerhamomyces anomalus, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces*
rouxii, *Zygotorulaspora florentina*. Existe una variedad de fuentes
20 comerciales para las cepas de levadura, tales como Lallemand Inc.
(Canadá), AB Mauri (Australia) y Lesaffre (Francia).

En una forma de realización, la mutagénesis es mutagénesis
 física, tal como mutagénesis con UV. En otra forma de realización, la
 mutagénesis es mutagénesis química.

En una forma de realización, la duración desde el paso a) hasta el paso c) es de 2 a 4 semanas. En una forma de realización, la duración desde el paso d) hasta el paso g) es de 6 a 48 semanas.

En una forma de realización, el número de repeticiones en el
5 paso g) es de 5 a 20.

En otra forma de realización, las colonias se cultivan durante un período de 2 a 10 días en el paso e) antes de seleccionar las colonias grandes y de rápido crecimiento.

En una forma de realización, en el paso g), la cantidad de
10 metilamina se incrementa en forma gradual, por ejemplo, en un porcentaje del 25 al 50% por cada repetición. En una forma de realización, la cantidad de metilamina en el paso e) es una cantidad suficiente para inhibir la tasa de crecimiento en un porcentaje del 25 al 75% respecto de la tasa de crecimiento en los medios selectivos sin
15 metilamina. En otra forma de realización, la metilamina puede incrementarse desde 0.05 g/L hasta 12 g/L antes de que la actividad de degradación de L-asparagina alcance una meseta.

En la presente también se provee una levadura producida mediante un método que se revela en la presente. También se provee
20 una levadura aislada, no modificada genéticamente, que expresa una asparaginasa asociada a la pared celular y que tiene actividad reductora de la asparagina bajo condiciones no inductoras. En una forma de realización, la levadura aislada, no modificada genéticamente, reduce la asparagina en al menos 20%, al menos 30%,
25 al menos 40%, al menos 50% o más, cuando se cultiva bajo

condiciones no inductoras. En una forma de realización, la asparaginasa asociada a la pared celular es expresada en forma constitutiva. En una forma de realización, la asparaginasa asociada a la pared celular es codificada por el locus *ASP3*. En una forma de realización, la cepa de levadura es una cepa de levadura industrial. En una forma de realización, la cepa de levadura es una cepa de levadura de panadería industrial.

También se proveen las cepas de levadura aisladas, depositadas ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) bajo los números de acceso 140515-01 ("RBAR-01"), 140515-02 ("RBAR-02") y/o 140515-03 ("RBAR-03").

Los presentes inventores también han demostrado que las cepas de levadura que se describen en la presente son particularmente útiles para reducir la asparagina, y en consecuencia reducen la formación de acrilamida durante la preparación y el procesamiento de los alimentos. Por consiguiente, en la presente también se provee un método para reducir la asparagina y, por ende, la formación de la acrilamida, durante la preparación o el procesamiento de alimentos. Dicho método comprende agregar una cepa de levadura (tal como la que se revela en la presente) a los alimentos bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos, en donde la levadura reduce la asparagina y, por ende, la formación de acrilamida, durante dicha preparación o procesamiento de los alimentos.

En una forma de realización, la cepa de levadura es una cepa inactiva. En otra forma de realización, la levadura es una cepa fresca. En otra forma de realización, la levadura es levadura seca activa.

El producto alimenticio puede ser cualquier producto alimenticio que típicamente contiene asparagina e incluye, sin limitaciones, un producto alimenticio a base de verduras, una bebida, un producto de panadería, un producto cereal, una fruta, legumbre, un producto lácteo o un producto cárnico. En una forma de realización, el producto alimenticio es un producto de panadería, tal como pan, galleta o pan entrelazado (pretzel). En una forma de realización, el producto alimenticio es una papa o un producto a base de papa. En otra forma de realización, el producto alimenticio es café.

En una forma de realización, el producto alimenticio es una papa o un producto a base de papa, y el paso de agregar la levadura a los alimentos bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende remojar previamente la papa o el producto a base de papa en una mezcla de agua y la cepa de levadura antes de la cocción.

En otra forma de realización, el producto alimenticio es un producto alimenticio a base de papa usado como tentempié o refrigerio (*snack*), y el paso de agregar la levadura a los alimentos bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende agregar la levadura a un sistema de tipo masa o bollo a base de papa antes de formar, extruir o de alguna otra manera crear

un producto comprimido que ha de cocerse; por ejemplo, hornearse, freírse o asarse.

En otra forma de realización, el producto alimenticio es café, y el paso de agregar la cepa de levadura bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende remojar
5 granos de café verde frescos en extracto de granos de café verde que ha sido tratado previamente con la cepa de levadura para reducir la asparagina, de tal modo que el extracto pre-tratado agote la asparagina de los granos de café antes de tostarlos.

10 En otra forma de realización más, el producto alimenticio es café, y el paso de agregar la cepa de levadura bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende el paso de fermentar granos de café verde molidos con la cepa de levadura antes de tostarlos.

15 En la presente también se provee un producto alimenticio con asparagina reducida, producido usando una cepa de levadura descrita en la presente o un método descrito en la presente.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo,
20 ha de entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican formas de realización de la invención, se ofrecen solamente a modo de ilustración, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención se tornarán evidentes para las personas versadas en el arte a partir de
25 esta descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

La invención será descrita a continuación en relación con los dibujos, en los cuales:

5 La Figura 1 es una representación esquemática de la estrategia de evolución adaptativa usada para crear las cepas de levadura reductoras de acrilamida (AR, por sus siglas en inglés) que se describen en la presente.

La Figura 2 muestra que las cepas de levadura AR degradan la L-asparagina incluso cuando se cultivan en medios enriquecidos. La
10 cepa de tipo natural, las cepas AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03), y una cepa de control GMO diseñada para sobreexpresar *ASP3*, fueron cultivadas en medio de YEG toda la noche (18 horas a 30 °C) antes de la inoculación de 2×10^7 células en 5 mL de medio de YEG fresco suplementado con 0.6 g/L de L-asparagina. Las células fueron
15 incubadas en medio de YEG + L-asparagina durante diversos períodos antes de la inactivación por calor a 80 °C. Se midió la concentración de L-asparagina residual en cada muestra mediante kit de ensayo enzimático colorimétrico. Los datos son representativos de los experimentos en duplicado.

20 La Figura 3 muestra que se necesita evolución adaptativa iterativa para generar las cepas de levadura AR. La cepa de tipo natural así como también las cepas AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03) se plaquearon sobre medios no selectivos (YEG + D-asparagina), medios ligeramente selectivos usados por Kamerud y Roon (YEG + D-asparagina + 3.1 g/L de metilamina), y medios altamente selectivos
25

usados en este estudio (YEG + D- asparagina + 12 g/L de metilamina). Se manifestaron números iguales de células por cada cepa en diluciones seriadas a un factor de 10. Las placas se incubaron a 30 °C durante cuatro días. Los datos son representativos de los experimentos en triplicado.

La Figura 4 muestra que las cepas de levadura AR derivan de manera evolucionaria de su progenitor de tipo salvaje. Se utilizó la técnica de huella digital basada en PCR inter-delta para comparar la herencia de las cepas de levadura AR con su cepa parental de tipo natural. Se extrajo el ADN genómico de los cultivos de toda la noche de cada una de las cepas y se usó como molde para la PCR inter-delta como se describió previamente (61). Los amplicones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Los datos son representativos de los experimentos en duplicado.

Las Figuras 5A-5D muestran que las cepas de levadura AR degradan en forma constitutiva la L-asparagina y expresan en forma constitutiva la asparaginasa asociada a la pared celular II (*ASP3*). Las cepas de levadura AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03), así como también su progenitor de tipo natural, fueron muestreadas cada seis horas durante el cultivo en medio de YEG. Los datos son representativos de los experimentos en duplicado. 5A) El seguimiento de la tasa de crecimiento de cada cepa fue realizado mediante medición de OD600. 5B) La actividad de degradación de L-asparagina de cada cepa fue medida por medio de un ensayo de degradación de L-asparagina estandarizado (tiempo de incubación de ensayo de 1

hora). 5C) La expresión relativa de *ASP3* en cada cepa fue medida en triplicado técnico mediante qPCR de ADNc retrotranscrito a partir de ARN total aislado. Los valores de cambio en número de veces para *ASP3* se calcularon usando el método $\Delta\Delta C_t$ y se normalizaron contra ACT1 y *ASP3* de tipo natural. 5D) La expresión relativa de *ASP1* en cada cepa se midió en triplicado técnico mediante qPCR de ADNc retrotranscrito a partir del ARN total aislado. Los valores de cambio en número de veces para *ASP1* se calcularon usando el método $\Delta\Delta C_t$ y se normalizaron contra ACT1 y *ASP1* de tipo natural.

La Figura 6 muestra que la cinética de la degradación de la L-asparagina difiere entre las cepas de levadura AR. La cepa de tipo natural, así como también las cepas AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03) fueron cultivadas en medio de YEG toda la noche (18 horas a 30 °C) antes de la inoculación de 2×10^7 células en 5 mL de medio de YEG fresco suplementado con 0,6 g/L de L-asparagina. Las células se incubaron en medio de YEG + L-asparagina durante diversos períodos antes de la inactivación por calor a 80 °C. La concentración de L-asparagina residual en cada muestra se midió por medio de kit de ensayo enzimático colorimétrico. Los datos son representativos de los experimentos en duplicado.

La Figura 7 muestra que un número mínimo de genes se expresan de manera diferencial globalmente en las cepas de levadura AR. El ARN total fue cosechado de las cepas de levadura de tipo natural y las cepas de levadura AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03) durante el crecimiento exponencial en medio de YEG. Las genotecas

de secuenciación de ARN (TruSeq v3) -preparadas a partir de ARN total- fueron secuenciadas sobre una plataforma en modo de alto rendimiento HiSeq2500 de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos (*paired-end*) de 2x100 pares de bases (bp). Las lecturas en bruto fueron filtradas a los efectos de la calidad y mapeadas al genoma de referencia de S288C. Los valores de cambio en número de veces Log2 (relativos a la cepa de tipo natural) son ilustrados para cada uno de los 6.604 ORFs de levadura (verificados, sin caracterizar, y dudosos). Las líneas punteadas están dibujadas a +1,5; 0; y -1.5 por referencia. La línea trazada dentro de cada fila es el valor de cambio en veces real para cada gen. Se usó agrupamiento jerárquico para reunir tanto los grupos de genes como las cepas.

Las Figuras 8A-8B muestran que muchos genes expresados en forma diferencial son comunes a cada una de las cepas de levadura AR. El ARN total fue cosechado de las cepas de levadura de tipo natural y las cepas de levadura AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03) durante el crecimiento exponencial en medio de YEG. Las genotecas de secuenciación de ARN (TruSeq v3) -preparadas a partir del ARN total- fueron secuenciadas sobre una plataforma en modo de alto rendimiento HiSeq2500 de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x100 bp. Las lecturas en bruto fueron filtradas a los efectos de la calidad y mapeadas al genoma de referencia de S288C. 8A) Los valores de cambio en número de veces Log2 (relativos a la cepa de tipo natural) son ilustrados para cada uno de los genes expresados en forma diferencial ($\geq | 1.5 | \log_2$ cambio en veces & $\geq$

100 conteos en la levadura de tipo natural). Las líneas punteadas están dibujadas a +1.5; 0; y - 1.5 por referencia. La línea trazada dentro de cada fila es el valor de cambio en veces real para cada gen. Se usó agrupamiento jerárquico para reunir tanto los grupos de genes como las cepas. 8B) Diagrama de Venn de la superposición entre los genes expresados en forma diferencial en cada una de las cepas de levadura AR.

Las Figuras 9A-9B muestran que muchos genes NCR y transportadores de aminoácidos son expresados en forma diferencial en cada una de las cepas de levadura AR. El ARN total fue cosechado de las cepas de levadura de tipo natural y las cepas de levadura AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03) durante el crecimiento exponencial en medio de YEG. Las genotecas de secuenciación de ARN (TruSeq v3) -preparadas a partir de ARN total- fueron secuenciadas sobre una plataforma en modo de alto rendimiento HiSeq2500 de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x100 bp. Las lecturas en bruto fueron filtradas a los efectos de la calidad y mapeadas al genoma de referencia de S288C. 9A) Los valores de cambio en número de veces Log2 (relativos al de tipo natural) son ilustrados para cada uno de los genes NCR anotados (71). 9B) Los valores de cambio en número de veces Log2 (relativos a la cepa de tipo natural) son ilustrados para cada uno de los genes transportadores de aminoácidos anotados (71). A y B) Las líneas punteadas están dibujadas a +1.5; 0; y -1.5 por referencia. La línea trazada dentro de cada fila es el valor

de cambio en veces real para cada gen. Se usó agrupamiento jerárquico para reunir tanto los grupos de genes como las cepas.

La Figura 10 muestra que la mayoría de las mutaciones identificadas en las cepas de levadura AR son comunes para todas. El ADN genómico fue cosechado de las cepas de levadura de tipo natural y cepas de levadura AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03). Las genotecas de secuenciación de ADN (Nextera XT) -preparadas a partir del ADN genómico-fueron secuenciadas sobre una plataforma MiSeq de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x300 bp. Las lecturas en bruto fueron filtradas a los efectos de la calidad y mapeadas al genoma de referencia de S288C. Se usaron formatos de resumen de lecturas (*pileups*) para llamar las variantes en cada nucleótido con relación a la secuencia consenso de S288C. Las variantes en las cepas de levadura AR fueron filtradas contra las variantes de tipo natural a fin de eliminar las mutaciones superfluas. Diagrama de Venn de la superposición entre las mutaciones filtradas en cada una de las cepas de levadura AR.

Las Figuras 11A-11D muestran que las cepas de levadura AR reducen la acrilamida en panes y tostadas. Se elaboró pan blanco y pan integral (ya sea con 0 o con 7% de sacarosa agregada) con la levadura de tipo natural o con las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03. Se analizaron los niveles de AA en el pan sin tostar, así como también en el pan con niveles de tueste bajo, medio y alto, tal como se define en la sección de materiales y métodos. 11A) Pan blanco con 0% de sacarosa. 11B) Pan blanco con 7% de sacarosa.

11C) Pan integral con 0% de sacarosa. 11D) Pan integral con 7% de sacarosa. Los datos son representativos de experimentos en duplicado.

La Figura 12 muestra que las cepas de levadura AR reducen la acrilamida en papas fritas. Se prepararon papas fritas con papas Russet frescas al remojar las papas cortadas, sin cocción, en agua ya sea sin levadura, con levadura de tipo natural, o con las cepas AR RBAR-01, RBAR- 02 y RBAR-03. Se analizaron los niveles de AA en el producto frito final. Los datos son representativos de experimentos en duplicado.

La Figura 13 muestra que la cepa de levadura AR RBAR-03 reduce la acrilamida en papas fritas en una manera dependiente de la dosis bajo tiempos de incubación cortos y temperatura alta. Las papas cortadas fueron procesadas previamente tal como se describe en la sección de los métodos y luego se incubaron durante 50 segundos en agua sola, o en agua que tenía ya sea 100, 200, 250 o 300 g/L de levadura AR en crema (23% de sólidos) a 68 °C. Después de freírlas, los niveles de acrilamida en las papas fritas fueron medidos mediante UPLC/MS. Los datos son representativos de experimentos en triplicado.

Las Figuras 14A-14B muestran que las cepas de levadura AR reducen la acrilamida en refrigerios fritos a base de papa. Se elaboró un producto a base de papa extruido y frito como refrigerio ya sea sin levadura, con la levadura de tipo natural, o con las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03. Se analizaron los niveles de asparagina en

diversos momentos durante el proceso de producción (A) y se analizaron los niveles de AA en el producto frito final (B). Los datos son representativos de experimentos en duplicado.

La Figura 15 muestra que las cepas de levadura AR reducen la acrilamida en galletitas dulces. Las galletitas dulces fueron elaboradas ya sea sin levadura, con la levadura de tipo natural, o con las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03. Se analizaron los niveles de AA en el producto final. Los datos son representativos de experimentos en duplicado.

La Figura 16 muestra que las cepas de levadura AR reducen la acrilamida en panes entrelazados (pretzels). Los panes entrelazados fueron elaborados ya sea con la levadura de tipo natural, o con las cepas AR RBAR- 01, RBAR-02 y RBAR-03. Se analizaron los niveles de AA en el producto final. Los datos son representativos de experimentos en duplicado.

La Figura 17 muestra que las cepas de levadura AR reducen la acrilamida en el café a través de la fermentación directa de los granos de café verde. Se incubaron granos de café verde molidos ya sea en agua sola, o con la levadura de tipo natural, o la cepa AR RBAR-03. Después de la incubación, los granos molidos se secaron y tostaron, y posteriormente se analizaron los niveles de AA.

La Figura 18 muestra que las cepas de levadura AR reducen la asparagina en extracto de café verde. Los extractos de café verde (18% de sólidos solubles) se incubaron con levadura AR a diversas concentraciones. Después de la incubación, los extractos fueron

clarificados mediante centrifugación, y se analizaron los niveles de L-asparagina. Los datos son representativos de experimentos en duplicado.

Descripción detallada de la invención

5 Los presentes inventores han demostrado que un proceso iterativo de mutagénesis aleatoria en combinación con presión selectiva posibilitó el desarrollo de una cepa de levadura industrial que tiene actividad reductora de la asparagina bajo condiciones no inductoras.

10 Por consiguiente, la invención provee un método para aislar una cepa de levadura que degrada L-asparagina bajo condiciones no inductoras. El método comprende los siguientes pasos:

 a) subcultivar una cepa de levadura de tipo natural, la cual expresa o tiene la capacidad de expresar una asparaginasa asociada
15 a la pared celular, en presencia de medios que contienen D-asparagina como la única fuente de nitrógeno;

 b) subcultivar en forma continua, realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento, y someter a mutagénesis en forma semanal;

 c) seleccionar los cultivos del paso b) cuando la tasa de
20 crecimiento alcanza el valor inicial;

 d) subcultivar en forma continua las células seleccionadas en medios selectivos que contienen metilamina, realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento, y mutagenizar en forma semanal hasta que la tasa de crecimiento en presencia de metilamina alcanza la
25 correspondiente a los medios selectivos sin metilamina;

e) aislar las colonias individuales del paso d) mediante plaqueo sobre medios selectivos que contienen metilamina, cultivar dichas colonias y seleccionar las colonias grandes y de rápido crecimiento;

5 f) evaluar las colonias seleccionadas del paso e) en cuanto a su capacidad para degradar L-asparagina bajo condiciones no inductoras, y seleccionar al menos una colonia con actividad de degradación de L-asparagina alta, en comparación con las células al inicio del paso d);

10 g) repetir los pasos d) a f) con las células seleccionadas del paso f), incrementando la concentración de metilamina cada vez que se repiten, hasta que la actividad de degradación de L-asparagina alcanza una meseta;

h) aislar la cepa del paso g) en el cual la actividad de degradación de L-asparagina ha alcanzado una meseta.

15 En una forma de realización, la asparaginasa asociada a la pared celular es codificada por el locus *ASP3* (Número de Acceso de GenBank NM_001182042.1).

20 En una forma de realización, la cepa de levadura de tipo natural es una cepa de levadura industrial. En una forma de realización, la cepa de levadura es levadura de panadería (*S. cerevisiae*).

La expresión “levadura industrial”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una cepa usada en procesos industriales, en contraste con la levadura de laboratorio que típicamente se usa para investigación en laboratorio. Típicamente, la levadura industrial tiende
25 a ser predominantemente diploide, aunque algunas son triploides,

tetraploides, o aneuploides. En forma similar, la levadura de laboratorio tiende a ser haploide.

Las cepas de levadura pueden incluir, sin limitaciones, géneros y especies del reino de los hongos. En una forma de realización, los
 5 géneros y las especies se seleccionan entre los usados en la producción de alimentos. En otra forma de realización, las especies son, sin limitaciones, las siguientes: *Aspergillus acidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Candida etchellsii*, *Candida milleri*, *Candida oleophila*, *Candida rugosa*, *Candida*
 10 *tropicalis*, *Candida versatilis*, *Candida zemplinina*, *Candida zeylanoides*, *Cyberlindnera jadinii*, *Cyberlindnera mrakii*, *Cystofilobasidium infirmominiatum*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Fusarium domesticum*, *Fusarium venenatum*, *Galactomyces candidum*, *Geotrichum candidum*, *Guehomyces*
 15 *pullulans*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Lecanicillium lecanii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Mucor hiemalis*, *Mucor mucedo*, *Mucor*
 20 *plumbeus*, *Mucor racemosus*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium commune*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium solitum*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia occidentalis*, *Pichia*
 25 *pijperi*, *Rhizopus microspores*, *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus*

oryzae, *Rhizopus stolonifer*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces vanriijiae*, *Scopulariopsis flava*, *Starmerella bombicola*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis candida*, *Torulopsis holmii*, *Trigonopsis cantarellii*,
 5 *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygotorulaspora florentina*. Son varias las fuentes comerciales que proveen las cepas de levadura, tales como Lallemand Inc. (Canadá), AB Mauri (Australia) y Lesaffre (Francia).

En una forma de realización, la mutagénesis tiene lugar
 10 mediante mutagénesis física, incluyendo sin limitaciones mutagénesis con UV, y mutagénesis basada en formas de radiación tales como mutagénesis basada en rayos X y rayos gamma. En una forma de realización, la mutagénesis física es mutagénesis con UV. Una persona versada en el arte conocería fácilmente las condiciones para
 15 mutagenizar con UV. Para la mutagénesis con UV, las células pueden estar expuestas a una fuente de luz UV (intensidad constante estándar) durante diversos lapsos de tiempo. La administración puede basarse en tasas de exterminio; en promedio, durante cada tratamiento, los cultivos pueden ser expuestos a luz UV suficiente para
 20 exterminar entre 25 y 90% de las células.

En otra forma de realización, la mutagénesis tiene lugar mediante mutagénesis química (por ejemplo, EMS: metanosulfonato de etilo).

Las personas versadas en el arte sabrían que la mutagénesis se
 25 usa para incrementar la tasa de mutación y, por ende, la posibilidad

de encontrar mutaciones de interés bajo las condiciones selectivas apropiadas.

La expresión “condiciones no inductoras”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualesquiera condiciones de cultivo bajo las cuales la degradación de L-asparagina extracelular es normalmente reprimida en la levadura de tipo natural. Por el contrario, la expresión “condiciones selectivas” hace referencia a las condiciones de cultivo donde la D-asparagina es la única fuente de nitrógeno y, para la presión selectiva incrementada, la presencia de un inhibidor del crecimiento, tal como metilamina, puede tener lugar.

La persona versada en el arte fácilmente conocería las condiciones para el cultivo de células de levadura. Por ejemplo, para el paso (a), las células de levadura pueden cultivarse a 30 °C en medios selectivos líquidos, tales como medios compuestos por base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (YNB-AA/AS, por sus siglas en inglés) suplementada con una fuente de carbono, tal como 2% (p/v) de sacarosa, y D-asparagina, tal como 10 g/L, pero la concentración puede variar de 0.5 a 15 g/L dependiendo de las cepas. Los cultivos de un día para el otro pueden ser subcultivados diariamente en medios frescos a una concentración consistente; por ejemplo, a una densidad óptica (OD_{600}) de 0.01.

Para (d) la selección con metilamina, las células se pueden cultivar a 30 °C en medios selectivos líquidos, tales como medios compuestos por base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (YNB-AA/AS) suplementada con una fuente de

carbono, tal como 2% (p/v) de sacarosa, y D-asparagina, tal como 10 g/L, pero la concentración puede variar entre 0.5 y 15 g/L dependiendo de las cepas, y suplementada adicionalmente con diversas cantidades de metilamina.

5 Para (e) el aislamiento de las colonias individuales seleccionadas con metilamina, las células pueden plaquearse y cultivarse a 30 °C sobre medios selectivos sólidos, tales como medios compuestos por base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (YNB-AA/AS) suplementada con una fuente de
10 carbono, tal como 2% (p/v) de sacarosa, D- asparagina, tal como 10 g/L, pero la concentración puede variar entre 0.5 y 15 g/L dependiendo de las cepas, y suficiente agar para solidificar los medios, y suplementada adicionalmente con diversas cantidades de metilamina.

 Para el mantenimiento general de la levadura, las células
15 pueden cultivarse a 30 °C sobre medios no selectivos sólidos, tales como medios de YEG-agar (2% de extracto de levadura + 1% de glucosa + 2% de agar).

 Los métodos para determinar la tasa de crecimiento son conocidos en el arte, y los ejemplos de dichas mediciones se describen
20 en la presente en la sección de los Ejemplos. En una forma de realización, la tasa de crecimiento se determina al medir la densidad óptica. La densidad óptica es el método más rápido y más ampliamente usado, y se basa en el hecho de que la levadura en suspensión acuosa dispersa la luz. La cantidad de luz dispersada es proporcional al
25 número de células por unidad de volumen; es decir, la concentración

celular. En una forma de realización alternativa, la tasa de crecimiento se determina al contar el número de células. El número de células en un volumen de cultivo puede contarse de manera precisa usando un microscopio y hemocitómetro. En una forma de realización adicional, la tasa de crecimiento sobre medios sólidos puede determinarse al comparar visualmente el tamaño de colonia entre las células cultivadas en formas equivalentes (es decir, el mismo tiempo, temperatura y medio). Por ejemplo, las colonias más grandes habrán crecido más rápido que las colonias más pequeñas.

La frase “colonias grandes y de rápido crecimiento”, tal como se emplea en la presente, se refiere a aquellas colonias que tienen la aparición visual más rápida y el tamaño de colonia más grande en relación con el tamaño promedio aproximado de las colonias sobre la placa. Dicha identificación puede ser cualitativa por naturaleza y la persona versada en el arte podría determinar fácilmente aquellas colonias que cumplen con dichos criterios.

La expresión “valor inicial”, en relación con la tasa de crecimiento tal como se emplea en la presente, se refiere a la tasa de crecimiento de la cepa en medios no selectivos y no inductores (medios que contienen buenas fuentes de nitrógeno; es decir, medios ricos en nutrientes, o sea, no únicamente D-asparagina y/o que contienen metilamina).

En una forma de realización, en el paso g), la cantidad de metilamina se incrementa en forma gradual; por ejemplo, en un porcentaje del 25 al 50% por cada repetición de tal modo que los

incrementos iniciales son pequeños y, más tarde, los incrementos son más grandes. En una forma de realización, la cantidad de metilamina en el paso e) es una cantidad suficiente para inhibir la tasa de crecimiento en un porcentaje del 25 al 75% respecto de la tasa de crecimiento en medios selectivos sin metilamina. En otra forma de realización, la metilamina puede incrementarse desde 0.05 g/L hasta 12 g/L antes de que la actividad de degradación de L-asparagina alcance una meseta.

Los marcos temporales para el subcultivo, y el número total de iteraciones evolucionarias varían, y dependen de un número de variables que incluyen la complejidad genética de la cepa de tipo natural, el tipo de mutagénesis usada (es decir, química, con UV, rayos X), la dosis de mutagénesis, y la potencia de la selección. En una forma de realización, el período de tiempo para el paso a) hasta el paso c) es de 2 a 4 semanas. En una forma de realización, el período de tiempo para el paso d) hasta el paso g) es de 6 a 48 semanas. En una forma de realización, el número de repeticiones en el paso g) es de 5 a 20.

Las colonias se pueden evaluar en cuanto a su capacidad para degradar L-asparagina bajo las condiciones no inductoras que se describen, por ejemplo, en la sección de los Ejemplos.

En la presente también se provee una levadura producida por los métodos que se describen en la presente. También se provee una levadura aislada, no modificada genéticamente, que expresa una asparaginasa asociada a la pared celular y que tiene actividad

reductora de la asparagina bajo condiciones no inductoras. En una forma de realización, la levadura aislada, no modificada genéticamente, reduce la asparagina en un porcentaje de al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% o más, cuando se
 5 cultiva bajo condiciones no inductoras. La persona versada en el arte puede evaluar fácilmente la capacidad de una cepa de levadura para reducir asparagina usando los métodos descritos en la sección de los Ejemplos. En una forma de realización, la asparaginasa asociada a la pared celular es codificada por el locus *ASP3*.

10 En una forma de realización, la levadura aislada, no modificada genéticamente, expresa en forma constitutiva una asparaginasa asociada a la pared celular. La “expresión constitutiva”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la expresión génica continua a lo largo de todo el crecimiento de un microorganismo, en lugar de la
 15 expresión selectiva que depende de las condiciones de cultivo. En una forma de realización, la cepa de levadura es una cepa de levadura industrial. En una forma de realización, la cepa de levadura es una cepa de levadura de panadería industrial.

Además se provee una cepa de levadura aislada, depositada el
 20 14 de mayo de 2015 ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC), Laboratorio de Microbiología Nacional, Agencia de Salud Pública de Canadá, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba, Canadá R3E 3R2 bajo los números de acceso 140515-01 (en la presente, bajo la denominación “RBAR- 01”), 140515-02 (en la
 25 presente, bajo la denominación “RBAR-02”) y/o 140515-03 (en la

presente, bajo la denominación “RBAR-03”). Los recibos de depósito y viabilidad de estas cepas se encuentran en el Apéndice A.

Los presentes inventores han demostrado, además, que estas cepas de levadura evolucionadas son particularmente útiles para reducir la asparagina y, a su vez, acrilamida, durante la preparación y el procesamiento de los alimentos y, en consecuencia, las cepas de levadura que se describen en la presente llevan el nombre de “levadura que reduce acrilamida” o “levadura AR”. Las expresiones “levadura reductora de acrilamida” y “levadura reductora de asparagina” se usan en la presente en forma intercambiable. Por consiguiente, en la presente también se provee un método para reducir la asparagina y, a su vez, la acrilamida, durante la preparación o el procesamiento de alimentos. El método comprende agregar a los alimentos una cepa de levadura tal como se revela en la presente bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos; en donde la levadura reduce la formación de la asparagina, y por ende la formación de la acrilamida, durante la preparación o el procesamiento de los alimentos.

En una forma de realización, la cepa de levadura es una cepa inactiva. El término “inactiva”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una composición de organismos de levadura inactivos, inviables y/o muertos que aún retienen su contenido nutricional y otras propiedades. Por ejemplo, la levadura puede cultivarse bajo condiciones que permiten la sobreexpresión de la proteína o las proteínas deseadas. La levadura puede usarse entonces para producir

la levadura inactiva; por ejemplo, a través de una variedad de métodos de pasteurización que incluyen, sin limitaciones, pasteurización a temperatura alta y en corto plazo, una variedad de métodos de esterilización que incluyen, sin limitaciones, calor húmedo e irradiación, una variedad de métodos de inactivación que incluyen, sin limitaciones, inactivación a presión alta, fotocatalítica y con luz pulsada, fotosensibilización, campos eléctricos que incluyen RF y pulsado, disrupción celular, sonicación, homogeneización, autólisis, e inactivación basada en químicos que incluyen, sin limitaciones, formaldehído, timerosol, cloraminas, dióxido de cloro, yodo, plata, cobre, antibióticos y ozono.

En otra forma de realización, la cepa de levadura es una cepa fresca. En otra forma de realización más, la cepa de levadura es levadura seca activa. La “levadura fresca” se refiere a una levadura que ha sido cultivada en medios no selectivos (por ejemplo, tales como los definidos más arriba) y centrifugados para eliminar la mayoría del líquido. La levadura fresca está viva y metabólicamente activa. La levadura fresca no es estable al almacenamiento y típicamente dura sólo entre 1 y 5 semanas bajo refrigeración. La típica levadura fresca comprende aproximadamente 25% de sólidos. La levadura seca activa (ADY, por sus siglas en inglés) es un producto procesado en el cual la levadura se seca hasta un contenido de humedad final del 3% (97% de sólidos). Las células de levadura en este producto están vivas pero resultan metabólicamente inertes bajo rehidratación. Cuando se sella al vacío, la ADY es típicamente estable al almacenamiento durante 2

a 4 años. Los procedimientos estandarizados para elaborar ADY son ampliamente conocidos en las industrias relacionadas con el uso de levadura, tales como en la elaboración de vinos, cervezas y panificados.

5 La frase “reductora de asparagina” o “reducción de asparagina”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la reducción del nivel de asparagina o la degradación de la asparagina en, por ejemplo, un producto alimenticio, en un porcentaje de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más, en comparación con una cepa de levadura
10 de control, tal como la cepa parental a partir de la cual evolucionó la cepa de levadura.

 La asparagina es un precursor restrictivo en la reacción que produce acrilamida durante la preparación o el procesamiento de los alimentos. Por consiguiente, en otra forma de realización, se provee
15 un método para reducir acrilamida en un producto alimenticio, que comprende agregar a los alimentos una cepa de levadura, tal como se describe en la presente, bajo las condiciones de preparación o procesamiento; en donde la levadura reduce la asparagina, de esta manera reduciendo la acrilamida, en el producto alimenticio. En la
20 presente también se provee el uso de las cepas de levadura que se describen en la presente para reducir la concentración de acrilamida durante la preparación o el procesamiento de los alimentos.

 La frase “reductora de acrilamida” o “reducción de acrilamida”, tal como se emplea en la presente, se refiere a la reducción del nivel
25 de acrilamida en el producto alimenticio en un porcentaje de al menos

20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más, en comparación con lo que sucede en ausencia de la cepa de levadura.

En una forma de realización, las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprenden la fermentación. Por ejemplo, los métodos y usos descritos en la presente son útiles para fermentar un producto alimenticio, incluyendo sin limitaciones, carbohidratos durante la elaboración de panes, procesamiento de papas, producción de galletas, producción de café, o fabricación de refrigerios. El término “fermentación”, tal como se emplea en la presente, se refiere al consumo de la levadura de los azúcares y otros nutrientes.

Por consiguiente, el “producto alimenticio” puede ser cualquier producto alimenticio que típicamente contiene asparagina e incluye, sin limitaciones, un producto alimenticio a base de verduras, una bebida, un producto de panadería, un producto cereal, una fruta, legumbre, un producto lácteo o un producto cárnico. En una forma de realización, el producto alimenticio es una papa o un producto a base de papa. En otra forma de realización, el producto alimenticio es café.

En una forma de realización, el producto alimenticio es una papa o un producto a base de papa, y el paso de agregar la levadura a los alimentos bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende remojar previamente la papa o el producto a base de papa en una mezcla de agua y la cepa de levadura antes de la cocción. En una forma de realización, las papas se remojan previamente a temperatura ambiente y se secan al aire antes de la

cocción. El término “cocción” incluye, sin limitaciones, fritura, asado y horneado. La concentración de la cepa de levadura descrita en la presente en la mezcla de agua/cepa de levadura, en una forma de realización, es de al menos 1, al menos 10, al menos 50, al menos 100
5 g/L (peso de la célula seca/volumen), o más. El tiempo de remojo previo, en una forma de realización, es de al menos 0.25 minutos, al menos 0.5 minutos, al menos 1 minuto, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 20 minutos, o más.

En otra forma de realización, el producto alimenticio es un
10 producto alimenticio a base de papa como refrigerio, y el paso de agregar la levadura a los alimentos bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende agregar la levadura a un sistema del tipo masa o bollo a base de papa antes de formar, extruir, o de alguna otra manera crear un producto comprimido
15 a ser cocido mediante horneado, fritura o asado.

En otra forma de realización, el producto alimenticio es café, y el paso de agregar la cepa de levadura bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende remojar los granos frescos de café verde en extracto de granos de café verde que
20 ha sido tratado previamente con la cepa de levadura que se revela en la presente para reducir la asparagina, de tal modo que el extracto pre-tratado agote la asparagina de los granos de café antes de tostarlos. En una forma de realización, el extracto es pre-tratado a una temperatura de entre 60 °C y 80 °C; opcionalmente, a 70 °C. El tiempo
25 de pre- tratamiento del extracto, en una forma de realización, es de al

menos 1 hora, al menos 5 horas, al menos 10 horas, al menos 15 horas, o más.

En otra forma de realización más, el producto alimenticio es café, y el paso de agregar la cepa de levadura bajo las condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende fermentar los granos de café verde molidos con la cepa de levadura antes de tostarlos.

En la presente también se provee un producto alimenticio que tiene asparagina reducida y, a su vez, acrilamida reducida, el cual es producido usando una cepa de levadura descrita en la presente o un método descrito en la presente.

El producto alimenticio puede ser cualquier producto alimenticio que es producido bajo condiciones de preparación o procesamiento que generan la conversión de asparagina en acrilamida. Las típicas condiciones de preparación y procesamiento que causan la formación de acrilamida incluyen preparación que comprende altas temperaturas de cocción (superiores a 120 °C) e incluye, sin limitaciones, fritura y horneado, tueste, asado, asado a la parrilla, braseado y rostizado. La acrilamida se encuentra típicamente en una concentración alta en los productos a base de papa, los productos de panadería y cualesquiera productos cereales o en granos. Por consiguiente, en una forma de realización, el producto alimenticio es un vegetal, tal como papa, taro, o aceituna, un producto de panadería, o un producto cereal o en granos. Los productos a base de papa incluyen, sin limitaciones, papas fritas, papitas de copetín, refrigerios horneados/fritos a base de

papa, y productos a base de papa moldeados. Los productos de panadería incluyen, sin limitaciones, bizcochos, galletitas dulces, galletitas saladas, panes, productos panificados sin leudar, productos rebozados, tortillas de harina y maíz, pastelillos, bases de tartas, 5 mezclas de tortas y magdalenas, y bollos de pasteles. Por ejemplo, los panes pueden incluir, sin limitaciones, panes y bollos frescos y congelados, bollo fermentado, bollo para pizza, panes arrollados y alargados, y variedades de panes, así como también productos panificados relacionados tales como refrigerios fritos u horneados o 10 pan rallado; y los pastelillos pueden incluir, sin limitaciones, budines, donas y tortas. Los productos cereales o en granos incluyen, sin limitaciones, los típicos cereales de desayuno, productos de suero y malta, tortillas de maíz y panes entrelazados. Otros alimentos que son procesados a altas temperaturas, incluyen, sin limitaciones, café, 15 frutos secos tostados, espárragos asados, bebidas a base de suero, malta y cerveza, chocolate en polvo, productos de pescado, productos de carne y pollo, sopa de cebolla y mezclas para untar, mantequilla de frutos secos, maníes recubiertos, porotos de soja tostados, semillas de girasol tostadas, alimentos fritos u horneados tales como falafel y 20 kobbbeh, y barras de chocolate.

La presente invención fue descrita anteriormente en líneas generales, pero puede entenderse de manera más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no están destinados a 25 limitar el alcance la invención. Se contemplan cambios en la forma y

la sustitución de equivalentes de acuerdo con lo que las circunstancias pudieran sugerir o tornar oportuno. Si bien en la presente se han empleado términos específicos, dichos términos tienen sentido descriptivo y no se incluyen con fines restrictivos.

- 5 Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran la presente invención:

Ejemplos

Materiales y Métodos

Cepas de levadura y medios

- 10 Las cepas de levadura se mantuvieron en placas de YEG-agar (2% p/v de glucosa, 1% p/v extracto de levadura, 2% p/v de agar). Se desarrollaron cultivos toda la noche a partir de colonias individuales inoculadas en medio líquido de YEG y se incubaron durante 18 horas a 30 °C (250 RPM).

- 15 *Ensayo de descomposición de la asparagina*

- La densidad celular de los cultivos de toda la noche fue medida con un hemocitómetro. Luego se inocularon 1×10^7 células en 5 mL de medio de YEG suplementado con 0.6 g/L de L-asparagina y se incubaron a 30 °C. En los momentos descritos en cada experimento,
- 20 se extrajeron 500 μ L de medio, se centrifugaron a 13.000 x g durante 1 minuto (temperatura ambiente), y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. La actividad de la asparaginasa fue inactivada al incubar el sobrenadante a 80 °C durante 30 minutos. La L-asparagina residual en el sobrenadante se midió mediante ensayo enzimático de acuerdo
- 25 con las instrucciones del fabricante (Megazyme, K-ASNAM).

Técnica de huella digital intra-delta

Se llevó a cabo la técnica de huella digital intra-delta tal como se describe en la referencia (61). Brevemente, se extrajo el ADN genómico de los cultivos de toda la noche usando el método con fenol-cloroformo tal como se describió previamente (62). Las reacciones de PCR de polimerasa Taq se ensamblaron de la siguiente manera: 100 ng ADN genómico, 1 μ M de cebador 1 (delta12: 5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') (SEQ ID NO:1), 1 μ M de cebador 2 (delta21: 5'-CATCTTAACACCGTATATGA) (SEQ ID NO:2), 200 nM mezcla dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1x solución amortiguadora Taq + KCl y 1 U polimerasa Taq (Thermo Fisher, EP0402). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador BioRad C1000 de acuerdo con el siguiente protocolo: 4:00 a 95 °C (desnaturalización inicial), 0:30 a 95 °C, 0:30 a 46 °C, 1:30 a 72 °C (35 ciclos), 10:00 a 72 °C (extensión final). Los productos de la PCR se procesaron en 2% p/v de gel de agarosa HRB (Amresco, E776) con solución amortiguadora TBE estándar a 8 V/cm, y se visualizaron imágenes con tinte GelGreen para ácido nucleico (Biotium).

Extracción de ARN

5 unidades OD₆₀₀ de células fueron aisladas mediante centrifugación (13,000 x g, 1 min, temperatura ambiente) y luego congeladas instantáneamente en hielo seco/metanol. Se extrajo el ARN total usando fenol ácido caliente tal como se describió previamente (63). Brevemente, las células se lavaron una vez con agua DEPC y luego se lisaron en solución amortiguadora TES y fenol

ácido-cloroformo durante 1 hora a 65 °C. La fase líquida se purificó con tubos Phase Lock Gel (5Prime) y fenol ácido-cloroformo seguido de otro tubo Phase Lock Gel y cloroformo:alcohol isoamílico. El ARN se precipitó con etanol toda la noche a -80 °C, se lavó con etanol (70%), y se resuspendió en agua DEPC.

PCR cuantitativa (qPCR)

Se purificaron 100 µg de ARN total en bruto usando una columna de centrifugación de ARN total EZNA (Omega Biotek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN purificado se cuantificó luego y se evaluó en cuanto a su calidad mediante análisis de ARN ScreenTape (Agilent Technologies).

Se convirtieron 800 ng de ARN total limpio en ADNc mediante transcripción reversa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioRad, iScript Reverse Transcription kit). Se realizó cuantificación relativa de expresión de *ASP1* y *ASP3* en triplicado. Las reacciones de qPCR iTaq Universal SYBR Green se ensamblaron de la siguiente manera: 8 ng de ADNc, 500 nM de cebador delantero, 500 nM de cebador reverso y 1x iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de PCR cuantitativa StepOnePlus (Applied Biosystems) de acuerdo con el siguiente protocolo: 0:30 a 95 °C (desnaturalización inicial), 0:15 a 95 °C, 1:00 a 60 °C (40 ciclos), de 65 a 95 °C en incrementos de 0,5 °C (curva de fusión). El análisis de datos de cuantificación relativa se realizó a través del método $\Delta\Delta C_t$, con normalización al gen constitutivo ACT1.

Los cebadores para la qPCR fueron los siguientes (en donde Fwd o forward es delantero y Rev es reverso):

ASP3_qPCR_Fwd 5'-GAGCGGATGAACAGGGATATT-3' (SEQ ID NO:3)

ASP3_qPCR_Rev 5'-GGGTCTGTGAGGTTGAAAT-3' (SEQ ID NO: 4)

5 ASP1_qPCR_Fwd 5'-CAAACCTGAGAGTGGACGGTAAG-3' (SEQ ID NO:5)

ASP1_qPCR_Rev 5'-GTTGACTATAGCTGGCGGAAA-3' (SEQ ID NO:6)

ACT1_qPCR_Fwd 5'-CGTCTGGATTGGTGGTTCTATC-3' (SEQ ID NO:7)

ACT1_qPCR_Rev 5'-GGACCACTTTCGTCTATTCTT-3' (SEQ ID NO:8)

Secuenciación de ADN

10 Se extrajo el ADN genómico de los cultivos de toda la noche usando el método de fenol-cloroformo como se describió previamente (62). La preparación de la genoteca Nextera XT se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina). La secuenciación se realizó sobre una plataforma MiSeq de Illumina en una configuración
15 de lectura de ambos extremos de 2x300 bp (GeneWiz).

Secuenciación de ARN

Se extrajo el ARN total, se limpió, y se controló su calidad tal como se describió anteriormente. La preparación de la genoteca TruSeq v3 se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante
20 (Illumina). La secuenciación se realizó sobre una plataforma en modo de alto rendimiento HiSeq2500 de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x100 bp (GeneWiz).

Elaboración del pan

La levadura para la elaboración del pan se preparó al inocular
25 un asa de cultivo de una placa de YEG en 75 mL de medio de YEG

líquido. Los cultivos se desarrollaron durante 18 horas (30 °C) y luego
 escalaron a 3 x 450 mL de medio de YEG y se cultivaron durante 24
 horas como se indicó anteriormente. El cultivo de levadura fue
 cosechado mediante centrifugación (10 min, 4,000 x g, temperatura
 5 ambiente). La levadura en crema se lavó dos veces mediante re-
 suspensión en agua esterilizada y centrifugación (10 min, 4,000 x g,
 temperatura ambiente).

La levadura se activó mediante pre-fermentación durante 45
 minutos a 29 °C (Tabla 1), después de lo cual se agregaron los
 10 ingredientes restantes a la levadura de la pre-fermentación y se
 mezclaron durante 21 minutos usando una batidora de pie (KitchenAid)
 equipada con un gancho para masa (Tabla 2). La masa se incubó
 durante 15 minutos a 22 °C ("tiempo de descanso"), se formó en dos
 barras iguales, y luego se incubó durante 1.5 horas a 35 °C (o hasta
 15 que la barra duplicó su tamaño). Las barras leudadas se hornearon
 luego durante 15 minutos a 204 °C.

Tabla 1 | Mezcla de pre-fermentación para la elaboración del pan.

Ingrediente	% de harina (p/p)
Agua	25
Levadura	4,7
Extracto de levadura	0.5
CaCO ₃	0.1
Azúcar Sacarosa	1
Sal (NaCl)	0.5

Tabla 2 | Mezclas de ingredientes finales para la elaboración del pan.

Ingrediente	Pan blanco	Integral
Torta de levadura	4.67	4.67
Agua (38 °C)	58.33	58.33
Harina blanca	100	50
Harina integral	--	50
Azúcar Sacarosa	0.7	0.7
Aceite vegetal	4	4
Sal (NaCl)	2.17	2.17

* Cantidades enunciadas como % de harina (p/p)

Después del horneado, las barras de pan se enfriaron a temperatura ambiente y se cortaron en rebanadas de 1.4 cm. Las muestras de pan se tostaron usando una tostadora de cocina estándar equipada con un termómetro digital (VWR Traceable). Los niveles de tueste fueron definidos de acuerdo con la temperatura de la tostadora como sigue: leve, 167 °C; medio, 217 °C; alto, 235 °C. A continuación, las muestras de pan y tostadas fueron molidas (molinillo analítico IKA Modelo A11BS1) y se homogeneizaron.

Elaboración de papas fritas

La levadura para la elaboración de las papas fritas se preparó tal como se describió previamente para el pan.

Se pelaron papas Russet, se enjuagaron, se cortaron y se blanquearon en agua a 90 °C durante 10 minutos a fin de desactivar las enzimas para dorar. Las papas blanqueadas se drenaron, se enfriaron a temperatura ambiente, y se agregaron ya sea a agua sola,

o a una mezcla de levadura AR y agua (Tabla 3). Las papas se incubaron en la mezcla de agua/levadura a temperatura ambiente, y se tomaron muestras a los 10, 20, 40 y 60 minutos, después de lo cual las muestras se secaron inmediatamente al aire a 80 °C durante 10 minutos. Las muestras de papa secadas se cocieron luego en aceite de maíz a 175 °C (Tabla 3).

Para evaluar la eficacia de la levadura AR bajo tiempos cortos de procesamiento y altas temperaturas, se incubaron 50 g de papa durante 50 segundos en 100 mL de agua sola, o bien en 100 mL de agua ya sea con 100, 200, 250, o 300 g/L de levadura AR en crema (23% de sólidos) a 68 °C. Antes de la adición de la papa, las mezclas de levadura/agua se equilibraron a 68 °C durante 10 minutos. Después del tratamiento, las muestras se secaron inmediatamente al aire a 80 °C durante 10 minutos. Las muestras de papa secas se cocieron luego en aceite de maíz en una freidora de lotes a 175 °C durante 5 minutos. Los tratamientos de las papas fritas y levadura AR se realizaron por triplicado. La significancia estadística fue determinada mediante la prueba T de Student, con relación a 0 g/L de levadura AR de control.

Tabla 3 | Mezclas de levadura y parámetros de cocción para el procesamiento de la papa.

	g/L de agua		Temp cocción (°C)	Tiempo Cocción (min)	Grosor (mm)
	Papa	Levadura			
Papas francesas	200	100	175	5	10 x 10

Producción de pellas para refrigerios

La levadura para la producción de pellas para refrigerios (*productos intermedios que se procesan a fin de elaborar refrigerios*) se preparó tal como se describió previamente para el pan.

Los ingredientes se agregaron en migas a una batidora de pie (KitchenAid) equipada con un accesorio de paletas planas y se mezclaron durante 5 minutos de acuerdo con la Tabla 4. La mezcla se extrudió en pellas (aproximadamente de 2 cm de largo) usando un troquel de 4 mm de diámetro. Las pellas resultantes se secaron en una capa única a 60 °C durante un período de 3 a 3.5 horas hasta lograr un contenido de humedad del 11%. Las pellas se almacenaron durante 1 semana en una bolsa de plástico hermética y luego se frieron en abundante aceite durante 10 segundos a 185 °C.

Tabla 4 | Mezcla de ingredientes finales para la producción de pellas para refrigerios

		% del peso de los ingredientes en total
	Gránulos de papa	51.05
	Hojuelas de papa	6.63
	Almidón de papa	6.63
	Sal	1.66
	Maltodextrina	0.33
20	Agua (objetivo: 38% de humedad)	29.52
	Levadura (aproximadamente 25% de sólidos)	4.23

Elaboración de galletitas dulces

La levadura para la elaboración de galletitas dulces se preparó tal como se describió previamente para el pan.

Los ingredientes de las galletitas dulces (Tabla 5) se procesaron al mezclar aceite, jarabe y azúcar durante 1 minuto a alta velocidad usando un accesorio de paletas planas (batidora de pie KitchenAid Classic Stand Mixer). El agente leudante y/o la levadura se disolvió en agua y se agregó al recipiente de mezclado. Los ingredientes secos fueron agregados y mezclados durante 6 minutos adicionales. La masa resultante se dejó reposar durante 20 minutos. Se colocaron 13 g de la masa de las galletitas haciendo presión sobre un molde circular con un diámetro de 65 mm, y se horneó a 180 °C durante 6 minutos (humedad buscada: entre 2.5 y 3.5%).

Tabla 5 | Mezcla de ingredientes finales para la elaboración de galletitas dulces

		% de peso total
15	Aceite	16.6
	Azúcar Sacarosa	16.9
	Jarabe de maíz	6
	Sal	0.50
	Sosa de hornear/ Levadura (DWB)	0.90
20	Harina multipropósito	19.2
	Harina de avena arrollada	38.0
	Agua	1.90

Elaboración de pan entrelazado

La levadura para el ensayo con pan entrelazado se preparó tal como se describió previamente para el pan.

Los panes entrelazados (pretzels) se prepararon mezclando primero los ingredientes secos (Tabla 6), agua y levadura durante 1 minuto usando una batidora de pie (KitchenAid Classic Stand Mixer) equipada con un accesorio de paletas planas. Se agregó manteca vegetal; la masa se mezcló durante 5 minutos adicionales, y luego fermentó durante 30 minutos a 35 °C. La masa fermentada se extruyó a través de un troquel de 9 mm a aproximadamente 40 mm de longitud y luego se dejó reposar durante 10 minutos. Las pellas se cocieron durante 20 segundos a 94 °C en un baño alcalino (1% NaOH). Los panes entrelazados se hornearon luego durante 25 minutos a 204 °C (humedad buscada: 15%). El producto horneado se secó a 119 °C durante 25 minutos (humedad buscada: 3,5%).

Tabla 6 | Mezcla de ingredientes finales para la elaboración del pan entrelazado

15	% en peso de Ingrediente	
20	Harina integral Levadura Agente leudante Manteca vegetal Sal Sacarosa Agua	64.5 0.5 0.5 2.00 1.00 2.00 29.50

Producción de café

La levadura para el ensayo del café se preparó como se describió previamente para el pan.

25 *Fermentación directa de los granos de café*

Se molieron granos de café verde (GCB, por sus siglas en inglés) (Brazil Serra Negra) hasta obtener un polvo (molinillo analítico IKA Modelo A11BS1). Se agregó agua purificada por osmosis inversa (RO, Reverse Osmosis) a una tasa de 75 mL por 40 g de GCB en polvo. Se
 5 agregaron 4 g de levadura en crema (25% de sólidos) o 3 g de agua RO para el control sin levadura a la pasta de GCB, y se fermentó durante 20 horas en una incubadora bajo agitación (250 rpm, 30 °C). Se tostaron 10 g de la pasta fermentada con un medidor de humedad IR (Ohaus MB45-2A0) durante 13 minutos a 200 °C.

10 *Preparación de extracto de café verde y tratamiento con levadura AR*

Se prepararon extractos de café verde (GCE, por sus siglas en inglés) al remojar iterativamente lotes de GCB en agua. Más específicamente, se remojaron 500 g de GCB en agua durante 16 horas a 70 °C y luego se descartaron. Posteriormente, los GCBs
 15 frescos se remojaron previamente en agua durante 1 hora a 70 °C antes de la incubación en el GCE durante 16 horas a 70 °C. Este proceso de remojar los GCBs frescos en el GCE se repitió hasta que el contenido de sólidos solubles alcanzó el 18%.

El GCE se trató con levadura AR al incubar diversas
 20 concentraciones de la levadura AR con GCE a temperatura ambiente durante diversos períodos de tiempo. Después del tratamiento, el GCE tratado con levadura AR se clarificó mediante centrifugación y se usó para la medición de la asparagina.

Cuantificación de la acrilamida mediante UPLC-QDA

Se pulverizaron porciones del tamaño de porciones de consumo de los alimentos sólidos en una procesadora de alimentos antes de la extracción de las muestras. Los productos alimenticios líquidos y en polvo fueron muestreados directamente. Las muestras de 1.00 g se colocaron en tubos de centrifuga de 50 mL, y se agregó 1 mL de estándar interno de acrilamida $^{13}\text{C}_3$ -marcado (200 $\mu\text{g/kg}$) y 9 mL de agua. Luego se tapó cada tubo y se lo sacudió con la mano, o se agitó brevemente para mezclar los contenidos del tubo. Los tubos se fijaron en un agitador rotatorio para mezclar los contenidos de los tubos durante 20 minutos. Los tubos se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 minutos con una centrifuga Eppendorf 5810R. Se extrajo prontamente una alícuota de 5 mL de capa acuosa clarificada mediante una pipeta para la filtración centrífuga. La pipeta se insertó a través de la capa superior de aceite, evitando la capa de sólidos del fondo con la punta de la pipeta cuando se extrajo una porción de la capa acuosa. La alícuota de 5 mL se colocó en un tubo de filtración centrífuga y se centrifugó a 9000 rpm durante un lapso de 2 a 4 minutos. Si el filtro se taponaba, se insertaba un tubo de filtro nuevo, el líquido sin filtrar se vertía sobre el nuevo filtro, y la centrifugación proseguía hasta que la mayor parte del líquido hubiera atravesado el filtro. Se acondicionaron cartuchos de extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction) Oasis HLB con 3.5 mL de metanol seguido de 3.5 mL de agua; se descartaron las porciones de metanol y agua. Cada cartucho se cargó con 1.5 mL del extracto filtrado. Se permitió que el extracto atravesara el material absorbente seguido de 0.5 mL de agua.

Luego la columna se eluyó con 1.5 mL de agua, y se recogió el eluyente para limpieza de SPE Accucat. El exterior de los cartuchos de SPE Accucat se marcó a la altura de 1 mL de líquido por encima del lecho absorbente, y luego los cartuchos A se acondicionaron con 2.5 mL de metanol seguido de 2.5 mL de agua. Las porciones de metanol y agua se descartaron. La totalidad del eluyente recogido de la SPE Oasis fue cargada y eluída a la marca de 1 mL antes de que el resto de las porciones eluidas fuera recolectada. Estas porciones se transfirieron a viales de muestreador automático de vidrio ámbar de 2 mL para análisis de Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC-MS, por sus siglas en inglés) en un sistema ACQUITY UPLC H-Class de Waters acoplado con un detector de masas ACQUITY QDa de Waters usando las siguientes configuraciones:

Composición de fase móvil: Ácido fórmico acuoso al 0.1%, metanol al 2%

Columna: ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 50 mm 1.8 μ m, de Waters

Tasa de flujo de la columna: 500 μ L/min

Temperatura de la columna: 20° C Volumen de inyección: 5 μ l

Tiempo de elución: 1 minuto

Modo de ionización: ionización positiva por electroaspersión

Voltaje a través del capilar: 600 V

Voltaje del cono: 5 V

Modo de MS: Monitoreo SIR m/z 72.04

Cuantificación de la L-Asparagina en extracto de granos de café mediante UPLC-PDA

El extracto de granos de café se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante se diluyó con agua Milli-Q para medir la L-asparagina mediante un sistema de Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC, por sus siglas en inglés) de Waters equipado con un detector de matriz de fotodiodos (PDA, Photodiode Array) (Acquity UPLC H-Class, Waters, Milford, MA, USA) y una columna C18 UPLC BEH Acquity (1.7 μ m; 2.1 mm X 100 mm, Waters, Milford, MA, USA). Se obtuvo L-asparagina de 99.6% de pureza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para preparar soluciones estándares con un intervalo de concentración de entre 15 y 500 pmol/ μ L para calibración y cálculo. La L-asparagina tanto en las muestras como en las soluciones estándares fue derivada mediante Kit UltraTM Derivatization AccQ•Tag (Waters, Milford, MA, USA) para agregar un grupo cromóforo para la detección de su absorbancia a 260 nm. El análisis se llevó a cabo con un volumen de inyección de 1 μ L y temperatura de columna a 43 °C. Las soluciones de concentrados del Eluyente A y Eluyente B AccQ•Tag UltraTM fueron adquiridas a través de Waters (Milford, MA, USA) para elución del gradiente del derivado de L-asparagina. El programa de elución detallado se mostró como sigue en la Tabla 7:

Tabla 7: Programa de elución:

Solvente A: concentrado de Eluyente A

Solvente B: 10% de Eluyente B en agua

Solvente C: Agua

Solvente D: concentrado de Eluyente B

	Tiempo (min)	Tasa de flujo (mL/min)	%A	%B	%C	%D
5	Inicial	0.7	10.0	0.0	90.0	0.0
	0.29	0.7	9.9	0.0	90.1	0.0
	5.49	0.7	9.0	80.0	11.0	0.0
	7.10	0.7	8.0	15.6	57.9	18.5
	7.30	0.7	8.0	15.6	57.9	18.5
10	7.69	0.7	7.8	0.0	70.9	21.3
	7.99	0.7	4.0	0.0	36.3	59.7
	8.59	0.7	4.0	0.0	36.3	59.7
	8.68	0.7	10.0	0.0	90.0	0.0
	10.20	0.7	10.0	0.0	90.0	0.0

Resultados

15 *Evaluación de un método de detección de una sola ronda existente para mutantes de desrepresión de ASP3*

A fin de eludir la NCR que normalmente mantiene el *ASP3* reprimido, se usó un método de detección-mutagénesis aleatoria que selecciona células de levadura capaces de crecer en D-Asparagina como única fuente de nitrógeno (60). Como toda otra vida conocida, *Saccharomyces cerevisiae* no utiliza D-aminoácidos. Sin embargo, la enzima Asparaginasa II asociada a la pared celular (*ASP3*) es única por el hecho de que puede degradar la D-asparagina, si bien en forma ineficiente (64). De manera importante, la Asparaginasa I (*ASP1*) citosólica no puede degradar la D- asparagina.

Si bien el crecimiento en la D-asparagina indica que el *ASP3* está siendo producido, también debe expresarse en fuertes condiciones de NCR a fin de ser completamente desreprimido. Por ende, el método de selección también incorporó metilamina en el medio. *S. cerevisiae* no puede utilizar metilamina como fuente de nitrógeno. Sin embargo, la metilamina compite con los iones amonio por los transportadores de amoníaco. Una vez en la célula, la metilamina no participa en reacciones metabólicas, pero sí causa una fuerte NCR equivalente al crecimiento en la fuente de nitrógeno preferida de la levadura: amoníaco (sulfato de amonio). Por lo tanto, la metilamina es un inhibidor del crecimiento (65, 66).

El cultivar células en medios que contienen D-asparagina como única fuente de nitrógeno y metilamina establece condiciones en las cuales la única forma en que las células pueden crecer es expresando *ASP3*, degradando D-asparagina externa, y luego importando los iones amonio liberados. Simultáneamente, los iones amonio liberados deben competir con la metilamina para ser usados para el crecimiento por la célula. Por ello, las células con los mayores niveles de expresión de *ASP3* ganan una ventaja selectiva debido a las condiciones de represión del medio de crecimiento. De manera importante, la levadura no puede usar el ácido D-aspartico liberado para el crecimiento.

Este método de selección (D-asparagina y metilamina) se usó previamente para identificar mutantes de *ASP3* desreprimidos en una cepa de levadura de laboratorio (DJ2-23C) (60). Los autores seleccionaron los mutantes de *ASP3* mediante el plaqueo directo de

células mutagenizadas EMS sobre placas selectivas (con 100 mM (3,1 g/L) de metilamina y 5 mM (0,66 g/L) de D- asparagina). Esto llevó a los autores a encontrar una variedad de variantes de *ASP3* desreprimidas. Sin embargo, luego de repetidos esfuerzos, no fue posible replicar aquellos resultados en una cepa de levadura de panadería industrial relevante.

Es importante notar que los autores del estudio original (Kamerud y Roon, 1986) posiblemente fueron capaces de encontrar mutantes de *ASP3* desreprimidos con facilidad porque estaban usando cepas de levadura de laboratorio haploides. Usar una cepa industrial -con un genoma significativamente más complejo (triploide, tetraploide, aneuploide)- hace que el hallazgo de mutantes desreprimidos sea sustancialmente más difícil. Esto ocurre porque las mutaciones con un fenotipo recesivo no serán desplegadas, porque estarán en una cepa haploide. Asimismo, existe una oportunidad significativamente mayor de que ocurra epistasia o mutaciones pleiotrópicas. Esencialmente, cualquier mutación beneficiosa individual será frenada por redundancias genéticas. Esto es raro en una cepa de laboratorio; especialmente aquéllas con un fondo haploide.

Desarrollo de una estrategia de mutagénesis aleatoria y evolución adaptativa para obtener una levadura reductora de acrilamida

Dado que la levadura de panadería industrial no es proclive a la estrategia de selección de una sola ronda de Kamerud y Roon, el método de detección fue rediseñado para incorporar una estrategia de

evolución adaptativa iterativa en combinación con múltiples rondas de mutagénesis (Figura 1). El objetivo de esta estrategia novedosa fue incrementar lentamente la presión selectiva en el tiempo, en conjunto con mutagénesis repetida, a fin de permitir la expresión completa de *ASP3* -y, por lo tanto, la descomposición de la asparagina- en condiciones de alguna otra manera represivas. De manera importante, las condiciones selectivas necesarias para asegurar la completa desrepresión de *ASP3* tuvieron que incrementarse lentamente, puesto que las concentraciones finales de D-asparagina y metilamina usadas para la selección evitan completamente el crecimiento de levadura no adaptada. Por lo tanto, solamente la combinación específica de mutagénesis aleatoria y evolución adaptativa empleada fue capaz de lograr el fenotipo AR.

Una colección de cultivos de cepas de levadura industriales disponibles a nivel comercial fue evaluada en cuanto al crecimiento en D-asparagina como única fuente de nitrógeno. Solamente una cepa industrial (cepa de levadura de panadería de Japón) tuvo un crecimiento apreciable en D-asparagina, lo que indica que contenía genes *ASP3* nativos. La cepa de laboratorio S288C se usó como control positivo, ya que se sabe que contiene *ASP3*.

En el momento cero, la cepa de tipo natural se subcultivó primero en medio mínimo que contenía D-asparagina (10 g/L) como única fuente de nitrógeno (sacarosa como fuente de carbono). En este medio, la cepa de tipo natural exhibió una tasa de crecimiento muy lenta y, bajo estas condiciones, las células con mutaciones naturales

que permiten la expresión más alta de *ASP3* tienen una ventaja selectiva. A fin de introducir variabilidad genética, las células se sometieron a mutagénesis con UV en forma semanal, a diversas dosis de UV (10-99% de dosis letal). La cepa se subcultivó en forma continua (diariamente) y se realizaron lecturas de OD₆₀₀ como seguimiento del crecimiento relativo. Ante cada subcultivo, las células se inocularon en medio fresco en la misma OD₆₀₀ inicial de 0,01. En el transcurso de un período de cuatro semanas, se observó un incremento en la tasa de crecimiento de la levadura mutagenizada en medios selectivos, de tal modo que fue comparable con la tasa de crecimiento en medios no selectivos. Esto sugirió que los inventores habían seleccionado células con expresión incrementada de *ASP3* bajo condiciones no inductoras, lo que da un buen trasfondo genético para comenzar a seleccionar mutantes desreprimidos (en condiciones de fuerte NCR o condiciones no inductoras) con máximo potencial expresivo.

Después de un mes, se introdujo metilamina en el medio de cultivo para impulsar una fuerte NCR, es decir, condiciones completamente represivas para *ASP3*. Usando el linaje mutagenizado como punto de partida, se agregó una mínima cantidad de metilamina al medio de cultivo (0.05 g/L). Esto redujo en forma significativa la tasa de crecimiento de las células a la misma tasa que cuando el subcultivo en los medios selectivos comenzó por primera vez.

En los siguientes cuatro meses, los linajes que crecieron más rápido se sometieron a subcultivo continuo en presencia de metilamina y mutagénesis con UV semanal (tal como se describió con anterioridad

en la presente). Cuando la tasa de crecimiento en presencia de metilamina fue comparable con la tasa de crecimiento en ausencia de metilamina, se obtuvieron colonias individuales mediante plaqueo sobre medios selectivos sólidos que contienen metilamina. Las colonias que mostraron rápido crecimiento (es decir, aparición visual más rápida y tamaño de colonia más grande en relación con el tamaño promedio aproximado de las colonias en la placa) fueron elegidas y evaluadas en cuanto a su actividad de degradación de L-asparagina. Las colonias que exhibieron alta actividad fueron luego subcultivadas adicionalmente y mutagenizadas con metilamina en forma más progresiva (0.05 g/L a 12 g/L de metilamina) a fin de incrementar la presión selectiva, y así mejorar la actividad de degradación de L-asparagina. Es de destacarse que la mutagenización en las diferentes etapas de la duración del subcultivo continuamente creó nuevos linajes. Solamente aquellos linajes que mostraron actividad de degradación de L-asparagina mejorada, con relación al cultivo predecesor directo, fueron evolucionados adicionalmente.

Como control, se mantuvo un linaje de levadura de tipo natural que nunca fue mutagenizado. Este linaje permitió determinar si la evolución adaptativa por sí sola (sin mutagénesis) era suficiente para generar el fenotipo deseado (*ASP3* totalmente desreprimido), o si el fenotipo adquirido era una consecuencia del enfoque de ingeniería evolucionaria (es decir, proveer variabilidad genética para la selección mediante mutagénesis con UV).

La levadura AR degrada la asparagina bajo condiciones de NCR

La expresión de *ASP3* (y por ende la capacidad de la levadura de panadería de degradar la asparagina) es reprimida bajo la mayoría de las condiciones de cultivo. A fin de maximizar la funcionalidad de las cepas AR, fue crucial alterar los mecanismos normales de la NCR que controlan la expresión del *ASP3*. Como tales, las cepas AR deberían degradar la asparagina incluso cuando se cultivan en medios enriquecidos en nutrientes. Para evaluar la funcionalidad de la levadura adaptada, se comparó su capacidad para degradar la asparagina en relación con la cepa parental de tipo natural no adaptada.

De acuerdo con el protocolo de evolución adaptativa, se identificaron tres variantes principales con el fenotipo deseado (desarrolladas en D-asparagina en presencia de metilamina): RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03. Cuando estas cepas se evaluaron en cuanto a la actividad de degradación de la asparagina, cada una de las cepas exhibió altos niveles de descomposición de asparagina incluso cuando se cultivó bajo condiciones ricas en nutrientes (represivas) (Figura 2). Comparados con los de la cepa de tipo natural -que en un período de hasta tres horas no mostraron actividad apreciable, y solamente mostraron actividad mínima con posterioridad (más del 60% de L-asparagina residual)- se observaron altos niveles de actividad de degradación de la L-asparagina en cada una de las cepas AR, incluso con un tiempo de ensayo tan corto como de una hora (RBAR-01: 82% de L-asparagina remanente a 1 hr; RBAR-02: 59% de L-asparagina remanente a 1 hr; RBAR-03: 54% L-asparagina remanente a 1 hr). De

manera importante, las cepas RBAR-02 y RBAR-03 funcionaron sustancialmente mejor en las marcas de una hora o dos horas cuando se compararon con una cepa de control GMO diseñada para expresar *ASP3* en forma constitutiva. Esto respalda la idea de que la evolución adaptativa con frecuencia puede generar soluciones funcionales que son superiores a la ingeniería inversa dirigida por humanos. Asimismo, estos datos sugieren que la levadura AR evolucionada adaptativamente tendrá una utilidad potenciada en la industria en donde frecuentemente se desean tiempos cortos de incubación (que ofrecen beneficios económicos y de seguridad para los alimentos). Tomadas en conjunto, las Figuras 1 y 2 indican que el protocolo de evolución adaptativa usado exitosamente alteró las condiciones normales de la NCR de modo tal que la levadura AR degrada la asparagina incluso cuando se cultiva en medios enriquecidos (YEG). De manera importante, todas las tres variantes AR se originaron de linajes de mutagénesis separados, por lo que es posible que sus fenotipos, y mecanismos de acción asociados, evolucionaron de manera independiente.

La evolución adaptativa iterativa es fundamental para la generación de las cepas AR

] Como se analizó previamente, la estrategia de selección de una sola ronda de Kamerud y Roon no es aplicable a las cepas de levadura de panadería industriales. Por lo tanto, se desarrolló una estrategia de evolución adaptativa iterativa para obtener cepas AR con la capacidad para degradar L-asparagina. El objetivo de esta estrategia

novedosa fue incrementar lentamente la presión selectiva en el tiempo, en conjunto con mutagénesis repetida, a fin de alcanzar suficiente diversidad genética para permitir la completa expresión de *ASP3*, y por ende la descomposición de la asparagina, en condiciones de alguna otra manera represivas.

Para confirmar la necesidad de este proceso iterativo para desarrollar las cepas AR, se evaluó el crecimiento de las cepas AR finales, así como también su progenitor de tipo natural, bajo diferentes grados de presión selectiva. Las cepas se plaquearon sobre medios mínimamente selectivos (YEG + D-asparagina), los medios moderadamente selectivos usados por Kamerud y Roon (YEG + D-asparagina + 3.1 g/L de metilamina), y los medios altamente selectivos usados en este estudio (YEG + D-asparagina + 12 g/L de metilamina). Como era de esperar, todas las cepas crecieron igualmente bien en las condiciones no selectivas (Figura 3, placa izquierda), pero solamente las cepas AR fueron capaces de crecer en las condiciones más selectivas (Figura 3, placa derecha). En forma concordante con los resultados anteriores, la cepa parental fue capaz de crecer en condiciones levemente selectivas, pero más lentamente que las cepas AR evolucionadas adaptativamente (Figura 3, placa del medio). Este diferencial de crecimiento indica los cambios evolucionarios de las cepas AR que les permiten crecer exitosamente en el ambiente más altamente selectivo. Tomados en forma conjunta, estos datos destacan la necesidad de incrementar en forma iterativa la presión selectiva a fin de seleccionar la diversidad genética sucesiva (evolución) en el

tiempo. De hecho, solamente este enfoque iterativo fue capaz de generar cepas de levadura de panadería industrial capaces de crecer bajo condiciones altamente selectivas y, como resultado, impartir el fenotipo AR único.

5 *Las cepas de levadura AR son descendientes evolucionariamente adaptados, funcionalmente distintos, de la cepa de tipo natural*

La evolución adaptativa dirigida permite el desarrollo altamente específico de fenotipos novedosos (por ejemplo, degradación constitutiva de la asparagina). Habiendo demostrado el fenotipo
 10 evolucionado de las cepas AR (Figuras 2 y 3), se hizo importante asegurar que estas cepas fueran efectivamente descendientes de la cepa de tipo natural, en lugar de cualquier cepa contaminante adquirida durante el cultivo. A fin de confirmar el linaje de las cepas AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03), se usó la técnica por PCR de
 15 huella digital inter-delta para tipificar cada cepa AR contra el progenitor de tipo natural. Las secuencias delta que flanquean los retrotransposones TY1 y TY2 se dispersan en todo el genoma de la levadura. Debido a la alta tasa de mutación en estos retrotransposones, la amplificación de las secuencias intra-delta
 20 genera un número de mezcla y bandas dimensionadas que pueden usarse para identificar cepas de levadura específicas (61). La técnica de huella digital de RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03 amplificó el número idéntico, la distribución de tamaño y la intensidad relativa de las bandas, en comparación con la cepa de tipo natural (Figura 4,
 25 comparar corridas 3, 4, 5 y 6). Esto sugiere que todas las cepas AR

adaptadas derivan de la misma cepa parental, lo que hace posible que compartan propiedades similares, por ejemplo: cinética de crecimiento, vitalidad, e idoneidad de uso en panadería industrial. De manera importante, las cepas de tipo natural y AR fueron tipificadas en forma diferente de las cepas de control de levadura de degradación de asparagina GMO y S288C no relacionadas (Figura 4, corridas 1 y 7).

Las cepas AR expresan la Asparaginasa II en forma constitutiva así como también degradan la L-asparagina

El sistema de NCR de la levadura permite que las células utilicen fuentes complejas de nitrógeno en la forma más efectiva posible. Es decir, cuando múltiples fuentes de diversa calidad están disponibles, la NCR regula la expresión génica catabólica de tal manera que las células preferentemente utilizan la fuente de mayor calidad disponible antes de pasar a la próxima fuente. De hecho, el medio de cultivo enriquecido, tal como YEG, contiene una mezcla compleja de una variedad de fuentes de nitrógeno que incluyen amonio, aminoácidos libres, péptidos y proteínas. En consecuencia, durante el crecimiento de la levadura en YEG, la cantidad y calidad de nitrógeno disponible, así como también la actividad de NCR, se encuentra en constante flujo. Como tal, aunque las cepas AR exhibieron una capacidad altamente reforzada para degradar la L-asparagina cuando se cultivan toda la noche en YEG (Figura 2), siguió siendo posible que la descomposición de la asparagina fuera restringida al ambiente de nitrógeno específico en este momento determinado.

Para evaluar si la expresión génica de *ASP3* -y la consecuente actividad de degradación de L-asparagina- era específica a un momento determinado o, en cambio, constitutiva, se llevó a cabo un experimento de evaluación en transcurso de tiempo, en el cual se
5 tomaron muestras de la levadura a lo largo de un período de 24 horas en total. Después del cultivo inicial, toda la noche, se inoculó un número igual de células de cada cepa en cultivos de YEG frescos y se cultivaron durante 24 horas. Las muestras de cada cepa fueron tomadas a intervalos de seis horas a fin de medir tanto la
10 descomposición de la L-asparagina (ensayo de 1 hr estándar), así como también la expresión génica de *ASP3* mediante qPCR.

Tal como se ilustra en la Figura 5A, todas las cepas crecieron a tasas comparables, lo que permitió la cosecha de igual número de células en cada punto temporal.

15 En términos de descomposición de L-asparagina, tanto la cepa RBAR-02 como la cepa RBAR-03 fueron capaces de degradar completamente la L-asparagina a través de todo el curso de tiempo (menos del 10% de L-asparagina residual), mientras que la RBAR-01 tuvo una capacidad moderada para catabolizar la L-asparagina
20 durante el mismo tiempo (promedio del 60% de L-asparagina residual). De manera importante, la cepa de tipo natural no exhibió ninguna descomposición apreciable de la L-asparagina en ningún momento específico durante el experimento (Figura 5B). Es de destacar que estos datos son consistentes con la degradación de la L-asparagina
25 observada previamente en la Figura 2.

Cuando se evaluaron en cuanto a la expresión de *ASP3*, todas las cepas AR exhibieron expresión constitutiva de *ASP3* (Figura 5C). Promediadas en todos los momentos, las cepas RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03 expresaron 4.7, 9.6 y 10.5 veces más *ASP3* que la cepa de tipo natural, respectivamente (Figura 5C). De manera interesante, la magnitud relativa de la expresión constitutiva reflejó la capacidad de cada cepa para degradar la L-asparagina en todo el curso de tiempo (comparar las Figuras 5B y 5C). Finalmente, la expresión de *ASP1* en todas las cepas AR no sufrió cambios comparada con la cepa de tipo natural (Figura 5D), lo que indica que la degradación de la L-asparagina observada es el resultado de la asparaginasa asociada a la pared celular II (*ASP3*), en lugar de la Asparaginasa I citosólica (*ASP1*). Tomados en conjunto, estos datos también indican que las cepas AR expresan *ASP3* en forma constitutiva y degradan L-asparagina en forma constitutiva como resultado de su evolución adaptativa.

Las cepas AR exhiben cinética de la Asparaginasa II única y reforzada

El catabolismo de la asparagina produce ácido aspártico y amoníaco, en donde ambos pueden convertirse en compuestos desabridos tales como pirazonas durante la cocción a alta temperatura. Por ende, en ciertas aplicaciones de producción de alimentos, puede ser beneficioso utilizar una levadura AR con niveles sub-máximos de actividad de Asparaginasa II a fin de evitar la producción de compuestos desabridos. Para evaluar la cinética de la Asparaginasa II en cada cepa de levadura AR, se inocularon los

cultivos de toda la noche en medios de YEG que contenían L-asparagina a un número fijo de células. Luego se tomaron muestras a intervalos de 30 minutos, y se evaluó la L-asparagina remanente. Si bien todas las tres cepas AR exhibieron descomposición de la L-asparagina comparada con la cepa de tipo natural de control, la descomposición cinética de la L-asparagina no fue igual entre las cepas AR (Figura 6). Más específicamente, la cepa RBAR-01 tiene una tasa más baja de descomposición de la L-asparagina comparada con ambas cepas RBAR-02 y RBAR-03 (RBAR-01: 82% de L-asparagina remanente a los 90 minutos), mientras que las cepas RBAR-02 y RBAR-03 fueron similares (RBAR-02: 54% de L-asparagina remanente a los 90 minutos; RBAR-03: 66% de L-asparagina remanente a los 90 minutos). Estos datos son consistentes con la descomposición de la L-asparagina observada en la Figura 2 y, tomados en conjunto con el resto de los datos, sustentan el fenotipo en la levadura AR adaptativamente evolucionada.

Las cepas AR exhiben expresión génica diferencial de los genes regulados por NCR

En virtud de su naturaleza no específica inherente, la mutagénesis aleatoria y la evolución adaptativa tienen la habilidad de cambiar la expresión de muchos genes diferentes, además del gen de interés. Habiendo determinado que las cepas de levadura AR efectivamente expresan *ASP3* en forma constitutiva y degradan la L-asparagina en presencia de fuentes de nitrógeno de calidad en condiciones de NCR de alguna otra manera activas (Figuras 2, 5 y 6),

los inventores buscaron evaluar los perfiles de expresión génica globales de la levadura AR.

Para hacer ello, se inoculó un número fijo de células de los cultivos de toda la noche en medio de YEG fresco, y los cultivos se incubaron durante seis horas. Luego se extrajo el ARN total de las muestras, y las genotecas de secuenciación de ARN fueron construidas a partir de ADNc retrotranscrito (cebado poli dT). La secuenciación se realizó sobre una plataforma en modo de alto rendimiento HiSeq2500 de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x100 bp.

En promedio, se obtuvieron 67.5 millones de lecturas por cepa, lo que equivale a 6,818 megabases y una cobertura de aproximadamente 560 veces (asumiendo un genoma haploide de 12 Mb). Los datos de secuenciación fueron generalmente de muy alta calidad, con 94% de puntajes Q iguales o superiores a 30, y un puntaje Q medio de 37.

Las lecturas en bruto para cada cepa se recortaron y filtraron para mayor calidad (puntaje Q igual o superior a 30) antes de mapearlas al genoma de referencia de S288C. En promedio, 97.6% de las lecturas se alinearon en forma exitosa. Las lecturas alineadas se usaron para construir conteos de lecturas por genes que luego formaron la base del análisis de expresión génica diferencial o gen diferencialmente expresado (DEG, por sus siglas en inglés). Para cada cepa AR, se calculó el cambio en veces $\log_2$ de cada gen relativo a la cepa de tipo natural (Figura 7). Los genes con valores de cambio en

número de veces de una magnitud superior a 1.5 y los conteos de lecturas de cepa de tipo de al menos 100 fueron considerados diferencialmente expresados (DE). La Figura 8A y la Tabla 8 comparan los niveles de expresión de DEG en cada cepa AR. De acuerdo con
 5 estos criterios para DEG, se observó 81(1.6%), 73 (1.4%), y 84 (1.6%) de DEG (de las 5.121 ORFs de S288C verificadas) en cada una de las cepas RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03, respectivamente. Asimismo, 50 de 113 (44.2%) DEG fueron comunes a todas las tres cepas, mientras que 75 (66.4%) DEG fueron comunes a al menos dos de las cepas AR
 10 (Figura 8B). Mediante análisis RNAseq, el *ASP3* estuvo entre los primeros genes regulados de manera ascendente en cada una las cepas AR (Tabla 8). De hecho, el *ASP3* se reguló de manera ascendente en 4.9, 7.8 y 8.9 veces en RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03, respectivamente, lo que es consistente con los datos de
 15 degradación de la L-asparagina y datos de qPCR obtenidos en las Figuras 5B y 5C.

Además del *ASP3*, el análisis de DEG reveló regulación diferencial sustancial de muchos genes NCR (Figura 9A). En total, 15 (19.0%), 15 (19.0%), y 17 (21.2%) de los 79 genes NCR controlados
 20 conocidos fueron diferencialmente expresados en RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03, respectivamente. Todos los enriquecimientos fueron en gran medida significativos a nivel estadístico mediante la prueba exacta de Fisher ($p \leq 0.0001$).

Finalmente, para analizar las redes y vías genéticas afectadas
 25 en la levadura AR desde una perspectiva global, también se realizó

análisis ontológico del gen DEG en cada una de las cepas AR (Tabla 9). Si bien muchos procesos biológicos, compartimientos celulares y funciones moleculares resultaron afectados de manera significativa, lo más obvio es una desregulación al por mayor del transporte de nutrientes en las cepas AR; especialmente, del transporte de aminoácidos (Figura 9A, Tablas 8 y 9). De hecho, muchos de los DEG en primer lugar (tanto los regulados en forma ascendente como los regulados en forma descendente) son enzimas permeasas, incluyendo UGA4, GAP1, MEP2, DAL4, DAL5, PUT4, OPT2, HXT5, HXT4, HXT10, HXT11, HXT14, HXT9, MUP1, TAT1, MUP3, y GNP1 (Figura 9A y Tabla 8).

Tomados en forma conjunta, estos datos indican que la levadura AR adaptativamente evolucionada exhibió perfiles de expresión génica diferencial sustanciales en relación con su progenitor no evolucionado. Asimismo, las vías principales afectadas en la levadura AR incluyen el control de NCR y el transporte de aminoácidos.

El ARN total fue cosechado de las cepas de levadura de tipo natural y las cepas de levadura AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03) durante el crecimiento exponencial en YEG. Las genotecas de secuenciación de ARN (TruSeq v3) -preparadas a partir del ARN total- fueron secuenciadas sobre una plataforma en modo de alto rendimiento HiSeq2500 de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x100 bp. Las lecturas en bruto fueron filtradas a los efectos de la calidad y mapeadas al genoma de referencia de S288C. Los valores de cambio en número de veces Log2 (relativos a

la levadura de tipo natural) se calcularon para cada uno de los 6,604 ORFs de la levadura (verificados, sin caracterizar, y dudosos). Los genes expresados en forma diferencial fueron llamados de acuerdo con los siguientes criterios: $\geq |1.5$ cambio en veces $\log_2$ & ≥ 100 conteos en la levadura de tipo natural. Ver Tabla 8.

Tabla 8: Genes expresados en forma diferencial en las cepas de levadura AR.

Gen ID	Nombre del gen	Descripción	RBAR-01 $\log_2$ FC ^a	RBAR-02 $\log_2$ FC	RBAR-03 $\log_2$ FC
Genes regulados en forma ascendente ($\geq 1.5 \log_2$)					
YKR034W	DAL80	Regulador negativo de múltiples vías de degradación de nitrógeno	3.408	4.596	4.776
YDL210W	UGA4	GABA (gamma-aminobutirato) permeasa	2.399	3.374	3.658
YKR039W	GAP1	Aminoácido permeasa general	2.528	3.277	3.254
YLR157C	ASP3-2	L-asparaginasa II asociada a pared celular implicada en el catabolismo de la asparagina	2.323	3	3.172
YLR160C	ASP3-4	L-asparaginasa II asociada a pared celular implicada en el catabolismo de la asparagina	2.282	2.955	3.161
YLR155C	ASP3-1	L-asparaginasa II asociada a pared celular implicada en el catabolismo de la asparagina	2.298	2.959	3.156
YLR158C	ASP3-3	L-asparaginasa II asociada a pared celular implicada en el catabolismo de la asparagina	2.283	2.943	3.132
YNL142W	MEP2	Amonio permeasa implicada en crecimiento de pseudohyphae	2.359	2.505	2.847
YIR028W	DAL4	Alantoina permeasa	1.823	2.557	2.655
YJR152W	DAL5	Alantoato permeasa	1.664	2.559	2.474
YJL052W	TDH1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), isozima 1	2.351	2.124	2.297
YHR174W	ENO2	Enolasa II, una fosfopiruvato hidratasa	2.325	1.933	2.257
YOR348C	PUT4	Prolina permeasa	2.046	2.677	2.222
		Subunidad alternativa putativa de succinato deshidrogenasa			
YLR164W	SHH4	(SDH)	1.832	2.053	2.188
YKL152C	GPM1	Fosfoglicerato mutasa tetramérica	2.146	1.884	2.135
YPR194C	OPT2	Transportador de oligopéptidos	1.773	1.723	2.099
YAL038W	CDC19	Piruvato quinasa	2.148	1.671	2.085
YIR032C	DAL3	Ureidoglicolato liasa	1.638	1.847	2.085
YGR254W	ENO1	Enolasa I, una fosfopiruvato hidratasa	2.014	1.688	1.976

5	YPL223C	GRE1	Hidrofilina esencial en proceso de desecación-rehidratación	2.376	1.71	1.949
	YKL060C	FBA1	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa	1.848	1.536	1.89
	YPL054W	LEE1	Proteína de dedo de zinc de función desconocida	1.449	1.823	1.844
	YKR097W	PCK1	Fosfoenolpiruvato carboxilquinasa	1.626	1.055	1.83
	YMR175W	SIP18	Hidrofilina de unión a fosfolípido	1.875	1.308	1.795
10	YHR096C	HXT5	Transportador de hexosa con afinidad moderada por glucosa	1.767	1.855	1.756
	YDR399W	HPT1	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa dimérica	1.468	1.434	1.741
	YPL265W	DIP5	Aminoácido dicarboxílico permeasa	1.288	1.671	1.702
	YOR028C	CIN5	Factor de transcripción de la familia yAP-1, cremallera de leucina en región básica (bZIP)	1.4	1.476	1.68
	YDL222C	FMP45	Proteína de membrana integral localizada a mitocondria	1.767	1.67	1.618
15	YAL062W	GDH3	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP(+)	1.606	0.843	1.543
	YEL065W	SIT1	Transportador de ferrioxamina B t	1.134	1.1	1.54
	YMR303C	ADH2	Alcohol deshidrogenasa II glucosa-reprimible	1.49	1.362	1.523
	YOL086C	ADH1	Alcohol deshidrogenasa	1.571	1.342	1.522
	Genes regulados en forma descendente ($\geq -1.5 \log_2$)					
20	YCR106W	RDS1	Factor de transcripción de grupo de zinc putativo	--	--	-8.722
	YCR104W	PAU3	Miembro de la familia de multigenes seripauperina	-6.071	--	-6.925
	YHR092C	HXT4	Transportador de glucosa de alta afinidad	-3.317	-3.409	-3.456
	YLR307W	CDA1	Chitina desacetilasa	-1.954	-1.404	-3.392
	YGL183C	MND1	Proteína requerida para recombinación y división nuclear meiótica	-2.213	-2.393	-3.269
25	YFL011W	HXT10	Transportador de hexosa putativo	-3.191	-2.056	-3.044
	YCL064C	CHA1	L-serina (L-treonina) deaminasa catabólica	-2.595	-1.296	-2.881
	YGR055W	MUP1	Metionina permeasa de alta afinidad	-2.547	-2.678	-2.69
	YHR184W	SSP1	Proteína implicada en el control de división nuclear meiótica	-2.031	-2.597	-2.585
	YGL184C	STR3	Cistationina beta-liasa peroxisomal	-2.243	-2.394	-2.528
	YJL223C	PAU1	Miembro de la familia de multigenes seripauperina	-0.731	-0.918	-2.492
	YLR303W	MET17	O-acetil homoserina-O-acetil serina sulfhidrilasa	-2.128	-2.467	-2.455
	YAL012W	CYS3	Cistationina gamma-liasa	-1.912	-2.143	-2.355
	YDL227C	HO	Endonucleasa específica de sitio	-1.468	-2.012	-2.322
	YOL156W	HXT11	Transportador de hexosa putativo que es casi idéntico a Hxt9p	-2.246	-1.749	-2.322
	YBR040W	FIG1	Proteína de membrana integral requerida para apareamiento eficiente	-1.11	-3.297	-2.285
	YNL318C	HXT14	Proteína con similitud con los miembros de la familia de transportadores de hexosa	-2.432	-3.297	-2.285
	YJL219W	HXT9	Transportador de hexosa putativo que es casi idéntico a Hxt11p	-2.316	-1.597	-2.17
	YBR069C	TAT1	Transportador de aminoácido para valina, leucina, isoleucina, y tirosina	-2.001	-1.691	-2.105

5	YHL036W	MUP3	Metionina permeasa de baja afinidad	-1.963	-2.155	-2.098
	YNR075W	COS10	Proteína de función desconocida	-2.381	-1.968	-2.089
	YHR216W	IMD2	Inosina monofosfato deshidrogenasa	-2.175	-1.872	-2.075
	YDR522C	SPS2	Proteína expresada durante esporulación	-2.191	-1.149	-2.044
	YDR508C	GNP1	Glutamina permeasa de alta afinidad	-2.019	-1.698	-2.035
10	YJR137C	MET5	Subunidad beta de sulfito reductasa	-1.762	-1.89	-1.978
	YOR313C	SPS4	Proteína cuya expresión es inducida durante la esporulación	-1.539	-1.182	-1.977
	YHR183W	GND1	6-fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilación)	-1.718	-2.108	-1.937
	YLR461W	PAU4	Miembro de la familia de multigenes seripauperina	-1.861	-1.404	-1.907
	YBR073W	RDH54	ATPasa dependiente de ADN	-1.658	-1.96	-1.831
	YLL063C	AYT1	Acetiltransferasa	-1.563	-1.686	-1.809
	YOR237W	HES1	Proteína implicada en la regulación de la biosíntesis de ergosterol	-2.082	-1.569	-1.798
	YJL038C	LOH1	Proteína implicada en el ensamblaje de pared de espora exterior	-1.67	-0.476	-1.786
	YDR345C	HXT3	Transportador de glucosa de baja afinidad de la principal superfamilia del facilitador	-1.698	-1.718	-1.755
	YLR308W	CDA2	Chitina desacetilasa	-1.638	-1.918	-1.726
15	YDR501W	PLM2	Factor de transcripción putativo contiene dominio asociado a Forkhead	-1.555	-1.815	-1.724
	YKL001C	MET14	Adenilil sulfato quinasa	-1.519	-1.754	-1.7
	YAR073W	IMD1	Proteína no funcional con homología con IMP deshidrogenasa	-1.574	-1.838	-1.7
	YNL277W	MET2	L-homoserina-O-acetiltransferasa	-1.52	-1.766	-1.689
	YOR183W	FYV12	Proteína de función desconocida	-2.234	-0.877	-1.672
	YLR343W	GAS2	1,3-beta-glucanosiltransferasa	-1.316	-1.529	-1.655
	YNR076W	PAU6	Miembro de la familia de multigenes seripauperina	-1.468	-0.717	-1.644
	YER070W	RNR1	Subunidad grande de isoforma principal de ribonucleótido-difosfato reductasa	-1.319	-1.211	-1.63
	YCR107W	AAD3	Arl-alcohol deshidrogenasa putativa	-1.387	-1.739	-1.63
	YHR153C	SPO16	Proteína meiosis-específica para ensamblaje de complejo sinaptonémico	-1.731	-0.749	-1.585
20	YDR542W	PAU10	Proteína de función desconocida	-2.432	-1.049	-1.585
	YBL031W	SHE1	Proteína de huso mitótico	-1.258	-1.123	-1.533
	YER103W	SSA4	Proteína de choque de calor que es altamente inducida ante estrés	-1.269	-1.409	-1.527
	YER091C	MET6	Metionina sintasa dependiente de cobalamina	-1.214	-1.506	-1.509
	YHR014W	SPO13	Regulador meiótico	-1.573	-1.286	-1.509
	YLR084C	RAX2	Proteína N-glicosilada	-1.304	-1.042	-1.508
	YLR437C	DIF1	Proteína que regula la localización nuclear de Rnr2p y Rnr4p	-1.316	-1.143	-1.506

^a Cambio en veces

Los genes expresados en forma diferencial identificados en la Tabla 8 fueron analizados mediante análisis de enriquecimiento de términos de GO (Tabla 9). Los valores p de enriquecimiento se

corrigen para la evaluación múltiple por medio del método de Holm-Bonferroni.

5

Tabla 9: Análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes (GO, Gene Ontology) en las cepas de levadura AR.

Proceso Biológico

	Término de ontología de genes	Valor p de enriquecimiento	Genes enriquecidos	% de DEG	% de genoma
15	proceso metabólico de aminoácido de la familia del aspartato	1.8E-06	12	7.0%	0.2%
	proceso metabólico de oxoácido	3.1E-05	25	14.5%	0.5%
	proceso metabólico de ácido orgánico	3.2E-05	25	14.5%	0.5%
	proceso metabólico de ácido carboxílico	7.2E-05	24	14.0%	0.5%
	transporte transmembrana de aminoácido	9.8E-05	8	4.7%	0.2%
20	proceso metabólico de compuesto organonitrógeno	1.2E-04	30	17.4%	0.6%
	transporte transmembrana de ácido orgánico	2.1E-04	8	4.7%	0.2%
	transporte de hexosa	2.4E-04	7	4.1%	0.1%
	transporte de monosacárido	2.4E-04	7	4.1%	0.1%
	proceso biosintético de aminoácido azufrado	5.3E-04	8	4.7%	0.2%
25	proceso metabólico de molécula pequeña	6.9E-04	32	18.6%	0.6%
	proceso catabólico de aminoácido de la familia del aspartato	9.5E-04	5	2.9%	0.1%
	transporte transmembrana de aniones	1.0E-03	9	5.2%	0.2%
	proceso catabólico de asparagina	1.3E-03	4	2.3%	0.1%

5	proceso reproductivo en organismo unicelular	2.2E-03	13	7.6%	0.3%
	formación de ascospora	3.6E-03	11	6.4%	0.2%
	desarrollo de célula	3.6E-03	11	6.4%	0.2%
	proceso metabólico de aminoácido azufrado	4.0E-03	8	4.7%	0.2%
	proceso catabólico de compuesto organonitrógeno	4.7E-03	11	6.4%	0.2%
	proceso biosintético de metionina	5.0E-03	7	4.1%	0.1%
	transporte de aminoácido	5.4E-03	8	4.7%	0.2%
	ensamblaje de pared de ascospora	5.4E-03	8	4.7%	0.2%
	ensamblaje de pared de espora	5.4E-03	8	4.7%	0.2%
	biogénesis de pared de espora	5.4E-03	8	4.7%	0.2%
	biogénesis de pared de ascospora	5.4E-03	8	4.7%	0.2%
	proceso de desarrollo implicado en la reproducción	6.1E-03	13	7.6%	0.3%
10	proceso reproductivo de organismo único	6.1E-03	13	7.6%	0.3%
	esporulación sexual	6.2E-03	11	6.4%	0.2%
	esporulación sexual que genera la formación de una espora celular	6.2E-03	11	6.4%	0.2%
	ensamblaje de pared de célula de tipo fúngico	6.3E-03	8	4.7%	0.2%
	ensamblaje de pared de célula	7.3E-03	8	4.7%	0.2%
	proceso metabólico de alfa-aminoácido	8.1E-03	14	8.1%	0.3%
15	respuesta celular a privación de nitrógeno	9.0E-03	4	2.3%	0.1%
	respuesta celular a niveles de nitrógeno	9.0E-03	4	2.3%	0.1%
	proceso metabólico de aminoácido celular	1.1E-02	16	9.3%	0.3%
	transporte de ácido carboxílico	1.4E-02	9	5.2%	0.2%
	proceso de ciclo celular meiótico	1.4E-02	15	8.7%	0.3%
	morfogénesis de estructura anatómica	1.5E-02	14	8.1%	0.3%
20	desarrollo de estructura anatómica	1.5E-02	14	8.1%	0.3%
	proceso metabólico de metionina	1.5E-02	7	4.1%	0.1%
	proceso metabólico de aminoácido de la familia de la serina	1.5E-02	7	4.1%	0.1%
	transporte de ácido orgánico	1.5E-02	9	5.2%	0.2%
	proceso metabólico de cisteína	1.5E-02	5	2.9%	0.1%
	morfogénesis de componente celular	1.7E-02	10	5.8%	0.2%
25	transporte transmembrana	1.8E-02	20	11.6%	0.4%
	proceso de desarrollo celular	1.9E-02	15	8.7%	0.3%
	proceso metabólico de	2.5E-02	9	5.2%	0.2%

5

nucleótido nicotinamida				
proceso metabólico de nucleótido piridina	2.8E-02	9	5.2%	0.2%
proceso metabólico de piruvato	2.8E-02	7	4.1%	0.1%
proceso metabólico de asparagina	3.2E-02	4	2.3%	0.1%
transporte de carbohidrato	3.8E-02	7	4.1%	0.1%
proceso glicolítico	3.9E-02	6	3.5%	0.1%
gluconeogénesis	4.7E-02	6	3.5%	0.1%

10

Compartimiento Celular				
Término de ontología de genes	Valor p de enriquecimiento	Genes enriquecidos	% de DEG	% de genoma
membrana plasmática	8.4E-08	28	16.3%	0.5%
periferia celular	6.3E-07	32	18.6%	0.6%
espacio perisplasmático unido a pared celular	3.0E-03	4	2.3%	0.1%
membrana	1.7E-02	50	29.1%	1.0%
Espacio periplásmico	2.0E-02	4	2.3%	0.1%

15

Función molecular				
Término de ontología de genes	Valor p de enriquecimiento	Genes enriquecidos	% de DEG	% de genoma
Actividad de transportador transmembrana de monosacárido	4.4E-06	7	4.1%	0.1%
Actividad de transportador transmembrana de hexosa	4.4E-06	7	4.1%	0.1%
Actividad de transportador transmembrana de azúcar	3.7E-05	7	4.1%	0.1%
Actividad de transportador específico de sustrato	4.0E-05	21	12.2%	0.4%
Actividad de transportador transmembrana específico de sustrato	7.0E-05	19	11.0%	0.4%
Actividad de transportador transmembrana de fructosa	8.5E-05	6	3.5%	0.1%
Actividad de transportador transmembrana de manosa	8.5E-05	6	3.5%	0.1%
Actividad de transportador transmembrana de carbohidrato	9.9E-05	7	4.1%	0.1%
Actividad de transportador de carbohidrato	9.9E-05	7	4.1%	0.1%
Actividad de transportador transmembrana de glucosa	1.3E-04	6	3.5%	0.1%
Actividad de transportador transmembrana de aminoácido	1.8E-04	8	4.7%	0.2%
Actividad de transportador transmembrana de L-aminoácido	2.1E-04	6	3.5%	0.1%
Actividad de transportador transmembrana de ácido carboxílico	2.7E-04	9	5.2%	0.2%

25

5	Actividad de transportador transmembrana	4.1E-04	19	11.0%	0.4%
	Actividad de transportador transmembrana de ácido orgánico	4.2E-04	9	5.2%	0.2%
	Actividad de asparaginasa	4.9E-04	4	2.3%	0.1%
	Actividad de transportador	6.8E-04	21	12.2%	0.4%
	Actividad de transportador transmembrana de galactosa	1.4E-03	4	2.3%	0.1%
	Actividad de transportador transmembrana de anión orgánico	1.6E-03	9	5.2%	0.2%
	Actividad de transportador transmembrana de anión	3.1E-03	10	5.8%	0.2%
	Actividad de transportador transmembrana de aminoácido neutro	1.2E-02	4	2.3%	0.1%
	Actividad de hidrolasa, que actúa sobre enlaces carbono-nitrógeno(pero no peptídicos), en amidas lineales	1.8E-02	6	3.5%	0.1%
	Actividad de transportador transmembrana de L-prolina	2.8E-02	3	1.7%	0.1%

10

a Genes expresados diferencialmente

Las cepas AR son genéticamente distintas de su progenitor no adaptativamente evolucionado

El principio fundamental que gobierna la evolución adaptativa es la acumulación de mutaciones que colectivamente forman un organismo con una ventaja de aptitud en un ambiente particular. Habiendo seleccionado las cepas AR sobre la base de su habilidad de degradar la L-asparagina en forma constitutiva (Figuras 1, 2, 5 y 6), y habiendo identificado subconjuntos de DEGs relevantes en las cepas AR (Figuras 7, 8 y 9), los inventores quisieron luego examinar las cepas AR para diferenciar las mutaciones a lo largo del genoma. Para ello, se aisló el ADN genómico de cada una de las cepas AR, así como también el progenitor, y se prepararon genotecas de secuenciación de ADN. La secuenciación se realizó sobre una plataforma MiSeq de

25

Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x300 bp.

En promedio, se obtuvieron 4.05 millones de lecturas por cepa, lo que equivale a 2,430 megabases y aproximadamente una cobertura de 203 veces (asumiendo un genoma haploide de 12 Mb). Los datos de secuenciación presentaron generalmente muy buena calidad, en donde el 84% de los puntajes Q fueron iguales o superiores a 30, y un puntaje Q medio de 35.

Las lecturas en bruto para cada cepa fueron recortadas y filtradas para mayor calidad (puntaje Q igual o superior a 30) antes de mapearse al genoma de referencia de S288C. En promedio, 96.12% de las lecturas fueron alineadas con éxito. Las lecturas mapeadas se usaron para generar estadísticas en formato *pileup* y secuencias consenso para cada base en el genoma. Esta información se comparó luego con el genoma de referencia y las mutaciones se anotaron sobre la base de la secuencia de referencia de S288C. Por último, las mutaciones identificadas en las cepas AR fueron filtradas contra aquéllas también identificadas en la cepa de tipo natural, a fin de eliminar las mutaciones superfluas. Para incrementar el poder estadístico para identificar mutaciones, los datos de secuenciación de ARN originalmente generados para DEG también se usaron para llamar las mutaciones. Como el genoma de la levadura es aproximadamente 72% codificante, el conjunto de datos de RNAseq provee buena cobertura para el grueso del genoma de levadura.

Las estadísticas de resumen para el análisis de mutaciones se brindan en las Tablas 10 y 11. Las comparaciones de superposición de mutaciones entre las cepas AR se ilustran en la Figura 10. De manera interesante, 15,918 de 21,047 (75,6%) mutaciones fueron comunes a todas las tres cepas, mientras que 17,571 (83,5%) fueron comunes a al menos dos de las cepas AR (Figura 10).

El ADN genómico fue cosechado a partir de cepas de levadura de tipo natural y cepas de levadura AR (RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03). Las genotecas de secuenciación de ADN (Nextera XT) - preparadas a partir del ADN genómico- fueron secuenciadas sobre una plataforma MiSeq de Illumina en una configuración de lectura de ambos extremos de 2x300 bp. Las lecturas en bruto fueron filtradas a los efectos de la calidad y mapeadas al genoma de referencia de S288C. Se usaron formatos pileup de lecturas para llamar las variantes en cada nucleótido con relación a la secuencia consenso de S288C. Las variantes en las cepas de levadura AR fueron filtradas contra las variantes de tipo natural a fin de eliminar las mutaciones superfluas. Ver Tabla 10.

Tabla 10: Resumen de las mutaciones totales identificadas en los conjuntos de datos de secuenciación de ADN y secuenciación de ARN.

	Tipo			
	natural	RBAR-01	RBAR-02	RBAR-03
Secuenciación de ARN				
Mutaciones identificadas	58.071	52.324	53.096	52.323
Filtradas contra tipo natural	--	3.728	4.098	3.778

5

Secuenciación de ADN				
Mutaciones identificadas	58.071	69.567	69.261	68.979
Filtradas contra tipo natural	--	17.435	17.190	17.223
Mutaciones combinadas	--	18.355	18.136	18.045
RNAseq única	--	920	946	822
DNAseq única	--	14.627	14.038	14.267
RNA/DNA seq común	--	2.808	3.152	2.956

10

Tabla 11 | Descomposición de los tipos de mutaciones en cepas AR.

Las mutaciones identificadas en la Tabla 10 se clasifican de acuerdo con su tipo.

15

		RBAR-01	RBAR-02	RBAR-03
	Mutaciones únicas totales	18.355	18.136	18.045
	Mutaciones no codificantes	10.820	10.619	10.690
	Mutaciones de promotores ^a	8.378	8.249	8.281
	TFBS ^b	4.894	4.792	4.862
	Non-TFBS	3.484	3.457	3.419
	Mutaciones intergénicas	2.442	2.370	2.409
	Mutaciones exónicas	9.205	9.130	9.028
	SNV ^c sinonimia	5.630	5.598	5.540
	SNV no sinonimia	2.975	2.939	2.928
	Inserción con desplazamiento de			
	marco de lectura	131	136	126
	Deleción con desplazamiento de			
	marco de lectura	86	77	77
	Sustitución con desplazamiento de			
	marco de lectura	21	16	12
	Inserción sin desplazamiento de			
	marco de lectura	176	188	163

20

25

5	Delección sin desplazamiento de			
	marco de lectura	98	102	99
	Sustitución sin desplazamiento de			
	marco de lectura	36	30	31
	Ganancia de terminación	45	38	46
	Pérdida de terminación	7	6	6

a Promotores definidos por la posición -1000 a -1 en relación con el sitio de inicio de transcripción

b Sitio de unión de factor de transcripción

10 c Variante nucleotídica única (Single nucleotide variant)

Dado que la mutagénesis aleatoria y la evolución adaptativa son métodos no dirigidos, es posible que la vasta mayoría de mutaciones identificadas en las cepas AR sean superfluas al fenotipo AR; es decir, la expresión constitutiva de *ASP3* y la degradación de la L-asparagina.

15 Por lo tanto, el lugar más lógico para que aparezcan las mutaciones fundamentales es dentro de las regiones codificantes de los genes relevantes o bien los promotores de dichos genes. De manera importante, para que las mutaciones de las regiones codificantes impacten la función de la proteína, deben afectar la estructura de la

20 proteína; es decir, la secuencia. De igual manera, para que las mutaciones en las regiones de los promotores impacten la expresión génica, es posible que aparezcan dentro de los sitios de unión del factor de transcripción (TFBS). Como tales, tanto las variantes nucleotídicas únicas (SNVs) exónicas sinonimias, como las

25 mutaciones de promotores no TFBS e intergénicas pueden filtrarse.

Tomados en conjunto, estos criterios de filtración dejan 8,469 (4,894 TFBS y 3,575 exónicas), 8,324 (4,792 TFBS y 3,532 exónicas), y 8,350 (4,862 TFBS y 3,488 exónicas) mutaciones candidato en RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03, respectivamente. Por lo tanto, es claro que la
 5 evolución adaptativa de las cepas AR generó cambios para la secuencia de ADN de las cepas, permitiéndoles así superar la represión NCR del *ASP3* y degradar la L- asparagina en forma constitutiva.

Las cepas AR reducen la formación de acrilamida en el pan y las
 10 *tostadas*

La acrilamida se forma en el pan cuando la asparagina libre reacciona con los azúcares reductores a temperaturas superiores a 120 °C. De manera importante, los azúcares reductores en el pan aparecen en exceso con relación a la asparagina; por lo tanto, los
 15 niveles de AA en el pan se correlacionan en gran medida con el contenido de asparagina (26, 67-69). Asimismo, es bien sabido que los niveles de AA en el pan se incrementan de manera significativa al tostarse, cuando la asparagina sin reaccionar en el interior de las rebanadas de pan se expone a alta temperatura (21). Por lo tanto, la
 20 eliminación de la asparagina en toda la rebanada antes de tostarse es clave para reducir el potencial de AA global del pan.

Habiendo establecido que las cepas de levadura AR expresan *ASP3* y degradan L-asparagina (Figuras 2, 5 y 6) en forma constitutiva, a continuación se quiso determinar si las cepas podrían usarse para
 25 la reducción de la AA en el pan. Para ello, se elaboró pan blanco y

pan integral ya sea con la levadura de tipo natural o con las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03, y se analizaron los niveles de AA tanto en el pan horneado como en el tostado (Figura 11). En todos los panes producidos con la levadura de tipo natural, los niveles de AA
5 oscilaron entre 30 y 67 ppb. Por el contrario, todos los panes producidos con las cepas de levadura AR mostraron niveles casi indetectables de AA (< 10 ppb), lo que equivale a una reducción promedio aproximada en AA del 80%. De manera consistente con los efectos del calentamiento sobre los niveles de AA, se observó una
10 clara correlación positiva entre el tueste y los niveles de AA en todos los panes producidos con todas las cepas. En promedio, el tueste bajo, medio y alto incrementó la AA en 3, 5 y 7 veces, respectivamente (Figura 11). Sin embargo, en la tostada producida con las cepas AR, los niveles de AA fueron sustancialmente inferiores, con una reducción
15 promedio en AA del 75 al 85%. En la mayoría de los casos, los niveles de AA en el pan tostado producido con las cepas AR fueron inferiores a los del pan sin tostar producido con la cepa de tipo natural (Figura 10). Es de destacar que estos resultados y condiciones son representativos de más de 10 experimentos independientes. Tomados
20 en conjunto, estos resultados validan las cepas de levadura AR como un método sólido y contundente para reducir los niveles de AA en panes y tostadas.

Las cepas AR reducen la formación de la acrilamida en las papas fritas

Como los alimentos a base de papa son ricos tanto en
25 asparagina como en azúcares reductores, tienden a contener algo de

los niveles más altos de la AA (12). Por consiguiente, habiendo establecido que las cepas de levadura AR expresan *ASP3* y degradan L-asparagina (Figuras 2, 5 y 6) en forma constitutiva, así como también su capacidad para reducir sustancialmente los niveles de AA en panes y tostadas (Figura 11), se procedió a determinar si las cepas podrían usarse para la reducción de la AA en las papas fritas. Aunque la levadura no conforma un ingrediente de las papas fritas, los pasos de remojo en agua son comunes en su producción. Por ello, se formuló la hipótesis de que remojar las papas en una mezcla de agua/levadura antes de freírlas podría reducir la AA en las papas fritas: durante este período, la levadura degradaría la asparagina sobre la superficie de la papa, reduciendo así la AA.

Para probar esta idea, se analizaron los niveles de AA en papas fritas hechas de papas Russet frescas remojadas solamente en agua, o en soluciones de agua/levadura ya sea de la levadura de tipo natural o de las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03 (Figura 12). En forma consistente con su contenido alto de azúcar y asparagina, las papas fritas sin levadura de control tuvieron niveles altos de AA: 440 ppb. Por el contrario, todas las cepas de levadura AR pudieron reducir sustancialmente el contenido de AA de las papas fritas (71% de reducción promedio: 127 ppb), en donde la cepa RBAR- 03 arrojó una reducción del 77% (100 ppb). De manera interesante, la cepa de levadura de tipo natural fue capaz de reducir la AA en las papas fritas en un porcentaje del 55% (200 ppb), con relación al control sin levadura. Esto posiblemente se deba a la capacidad natural de la

levadura para fermentar azúcar. De hecho, en la mayoría de los alimentos afectados por AA -es decir, los alimentos que no son a base de papa- la asparagina es el reactivo limitante para la formación de AA. Sin embargo, en las papas, la asparagina y los azúcares reductores están presentes en cantidades apenas equimolares (70); por lo tanto, limitar el azúcar reductor es una medida de mitigación de AA efectiva para las papas. Sin embargo, se sabe que los niveles de azúcares reductores y asparagina varían dependiendo del cultivar de la papa, la temporada y las condiciones de almacenamiento (70). Por ende, la efectividad de una levadura de tipo natural -que solamente puede consumir azúcares y solamente bajo condiciones de procesamiento favorables, por ejemplo, suficiente tiempo de contacto- para reducir la acrilamida en productos de papa será variable. Por consiguiente, las cepas de levadura AR, con su capacidad para degradar asparagina, son capaces de reducir los niveles de AA de manera significativa y consistente más allá de la simple fermentación de los azúcares.

Para evaluar en mayor medida la levadura AR bajo condiciones de tiempo de contacto relativamente corto y temperatura alta, preparamos papas cortadas tal como se describió anteriormente, y las remojaamos en agua sola, o en una mezcla de agua/levadura AR (solamente RBAR-03) durante 50 segundos a 68 °C. Como se ilustra en la Figura 13, observamos una relación dependiente de la dosis entre la cantidad de levadura AR usada y la reducción de la acrilamida observada. Bajo las condiciones evaluadas, la concentración más baja

de levadura AR (100 g/L) fue capaz de reducir la acrilamida en un porcentaje del 19% (1002 ppb en comparación con hasta 1240 ppb). Sin embargo, en 250 g/L de levadura AR, observamos una reducción significativa en la acrilamida del 49% (632 ppb en comparación con hasta 1240 ppb). De manera interesante, no observamos ningún beneficio significativo usando 300 g/L de levadura AR, lo que sugiere que el 50% puede ser el máximo para la reducción de la acrilamida bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, bajo otras condiciones más optimizadas, las reducciones de la acrilamida por la levadura AR pueden ser sustancialmente superiores. Es de destacar que estos resultados y condiciones son representativos de múltiples experimentos independientes. Tomados en conjunto, estos datos indican que la levadura AR es efectiva para reducir la AA en papas fritas, y en términos más amplios, en alimentos fritos hechos de papas frescas.

Las cepas AR reducen la formación de la acrilamida en pellas para refrigerios

Habiendo establecido la utilidad de las cepas AR para reducir AA en productos a base de papas frescas (Figura 14), se procedió a evaluar su eficacia en alimentos a base de harina de papa como refrigerios. Para ello, se elaboró un producto a base de papa, frito y extruido, como refrigerio, ya sea con la levadura de tipo natural o con las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03, y se analizaron los niveles de asparagina durante el procesamiento. Los niveles de AA también se midieron en el producto frito final 15 (Figura 14). Con

respecto a la asparagina, relativa al control sin levadura o con la levadura de tipo natural, todas las cepas AR fueron capaces de degradar la asparagina (Figura 14A). Más específicamente, las cepas RBAR-01 y RBAR- 03 consumieron toda la asparagina en las pellas para refrigerios en un tiempo de tratamiento tan corto como de 30 minutos. Por el contrario, la actividad de degradación de asparagina en la cepa RBAR-02 fue menos robusto en este modelo de alimento: 45% de reducción en 60 minutos. Sin embargo, esta actividad fue fácilmente evidente, en relación con el control sin levadura o con la levadura de tipo natural.

En términos de reducción de AA, todas las cepas AR fueron efectivas. En promedio, las cepas AR redujeron la AA en un porcentaje del 75% (100 ppb promedio vs. 400 ppb; Figura 14B). De modo consistente con su capacidad superior demostrada para degradar la asparagina en este modelo de alimento, las cepas RBAR-01 y RBAR-03 generaron los niveles más bajos de AA: 82 y 85% de reducción (70 y 60 ppb), respectivamente (Figura 14B). De manera interesante, y contrariamente al caso con las papas fritas, la levadura de tipo natural no fue capaz de reducir los niveles de AA en las pellas para refrigerios. Esto posiblemente se deba a la presencia de ingredientes que no contienen asparagina en la mezcla de las pellas para refrigerios (almidón de papa y maltodextrina). Estos ingredientes incrementan de manera significativa el contenido de azúcares reductores de la mezcla, lo que de esta manera hace que la asparagina sea el reactivo limitante para la formación de AA en las pellas para refrigerios. Como tal, la

actividad de fermentación del azúcar de la levadura es ineficaz para reducir la AA. Es de destacarse que estos resultados y condiciones son representativos de múltiples experimentos independientes. En forma colectiva, estos datos confirman que la levadura AR se puede
5 usar exitosamente para reducir la AA en alimentos a base de harina de papa, fritos y extruidos.

Las cepas AR reducen la formación de acrilamida en las galletitas dulces

Habiendo establecido la utilidad de las cepas AR para reducir la
10 AA en panes y tostadas, productos a base de papas frescas, y productos a base de papa procesados (Figuras 11, 12, 13 y 14), se procedió a evaluar su eficacia en las galletitas dulces.

Para ello, se elaboró un producto de galletita ya sea con la levadura de tipo natural o con las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y
15 RBAR-03, y se analizaron los niveles de AA en el producto frito final (Figura 15). En comparación con el control sin levadura, todas las cepas AR fueron capaces de reducir los niveles de AA en el producto final (reducción promedio del 69% - promedio 103 ppb vs. 330 ppb), donde la cepa RBAR-03 fue la más efectiva (79% de reducción– 70
20 ppb vs. 330 ppb). En forma similar a la situación con las papas fritas (Figura 12), se notó que la levadura de tipo natural fue capaz de reducir AA hasta cierto nivel (30% de reducción - 230 ppb vs. 330 ppb), lo que posiblemente se deba a la actividad fermentativa. Sin embargo, las cepas AR han potenciado en gran medida la capacidad para reducir
25 AA debido a su capacidad para degradar la asparagina. Es de destacar

que estos resultados y condiciones son representativos de múltiples experimentos independientes. En forma colectiva, estos datos indican que la levadura AR es efectiva para reducir la AA en las galletitas dulces.

5 *Las cepas AR reducen la formación de la acrilamida en panes entrelazados*

Habiendo establecido la utilidad de las cepas AR para reducir la AA en panes y tostadas, productos a base de papas frescas, productos a base de papa procesados y galletitas dulces (Figuras 11,
10 12, 13, 14 y 15), se evaluó su eficacia en panes entrelazados. Los panes entrelazados (pretzels) típicamente contienen niveles altos de AA debido a un proceso de lavado de hidróxido de sodio para incrementar la acción de dorar durante su elaboración; de hecho, la formación de AA se acelera a un pH alto.

15 Los panes entrelazados se elaboraron ya sea con la levadura de tipo natural o con las cepas AR RBAR-01, RBAR-02 y RBAR-03, y se analizaron los niveles de AA en el producto final (Figura 16). Comparadas con la levadura de tipo natural, todas las cepas AR fueron extremadamente capaces de reducir los niveles de AA en el producto
20 final (reducción promedio del 98% - promedio < 5 ppb vs. 200 ppb). Es de destacar que estos resultados y condiciones son representativos de múltiples experimentos independientes. En forma colectiva, estos datos indican que la levadura AR es altamente efectiva para reducir la AA en los panes entrelazados.

La levadura AR reduce la asparagina y la formación de acrilamida en el café

Habiendo establecido la utilidad de las cepas AR para reducir la AA en panes y tostadas, productos a base de papas frescas, productos a base de papa procesados, galletitas dulces, y panes entrelazados (Figuras 11, 12, 13, 14, 15 y 16), se evaluó su eficacia en el café. Como primera prueba de concepto, se evaluó la levadura de tipo natural y la cepa de levadura AR RBAR-03 en las fermentaciones de granos de café verde molidos (Figura 17). Comparada con el control sin levadura, la cepa de tipo natural redujo la AA en un porcentaje del 52% (191 ppb vs. 394 ppb), presumiblemente debido a la fermentación de los azúcares reductores en el grano. Sin embargo, la cepa AR RBAR-03, con su capacidad para consumir tanto azúcar como asparagina, redujo la AA en un porcentaje del 92% (32 ppb vs. 394 ppb).

Dado que la AR levadura es capaz de reducir AA cuando se aplica directamente a los granos de café verde molidos (Figura 17), la capacidad de la levadura AR para reducir la asparagina se evaluó a continuación en un extracto de café verde acuoso. Dicho extracto, cuando se agota de los compuestos de interés, tales como asparagina o cafeína, puede usarse entonces para extraer selectivamente ese compuesto de los granos de café verde antes de tostarlos. Si la asparagina se extrae de esta manera, la AA será disminuida en el café tostado resultante.

Tal como se ilustra en la Figura 18, la levadura AR (RBAR-03) es capaz de reducir la L-Asparagina en GCE (18% de sólidos) en una forma de que depende del tiempo y la concentración. En la concentración más alta de levadura AR (10^9 células/mL), se consumió más del 95% de la L-Asparagina dentro de 30 minutos (340 g/100g de L-Asparagina, tiempo = 0 vs. 13.1 g/100g de L-Asparagina, tiempo = 30 min), mientras que en la concentración intermedia (10^8 células/mL), esto se alcanzó dentro de los 90 minutos (340 g/100g de L-Asparagina, tiempo = 0 vs. 10.5 g/100g L-Asparagina, tiempo = 30 min). En la concentración más baja de levadura AR (10^7 células/mL), el consumo de L-Asparagina fue incompleto, con sólo 43% de reducción en 150 minutos (340 g/100g de L-Asparagina, tiempo = 0 vs. 195 g/100g de L-asparagina, tiempo = 150 min). Es de destacar que estos resultados y condiciones son representativos de múltiples experimentos independientes. En forma conjunta, estos datos confirman que las cepas AR -que tienen la capacidad para degradar L-Asparagina- tienen la capacidad de reducir de manera eficiente la L-Asparagina y la AA en el café.

Conclusión

A pesar de la obvia necesidad de mejores herramientas de reducción de AA, los métodos actualmente disponibles no ofrecen una eficacia lo suficientemente alta o bien son difíciles de implementarse a nivel técnico, logístico y financiero. Para abordar estas cuestiones, se desarrolló una tecnología de reducción de AA novedosa basada en la levadura de panadería. Usar levadura para lograr la reducción de

AA en los alimentos es una solución ideal por las siguientes razones:

- 1) ya consiste en un ingrediente alimenticio natural al cual los humanos tienen larga data de exposición; 2) la levadura se ajusta al estado “Generalmente Considerado como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) de la FDA de los Estados Unidos o equivalentes internacionales en la mayoría de las jurisdicciones del mundo; 3) la levadura ya consiste en un ingrediente principal de la mayoría de los alimentos para los cuales la AA es un problema significativo; por ejemplo, el pan; 4) la levadura AR puede incorporarse como un tratamiento transitorio en otros alimentos para los cuales la AA es un problema; por ejemplo, productos a base de papa, cereales, refrigerios y café; 5) la levadura no es costosa de producir y es fácil de trabajar y 6) la mayoría de los productores de alimentos comerciales tienen experiencia anterior en el trabajo con levadura. Asimismo, debido a su evolución adaptativa de una cepa de levadura de panadería, las cepas de levadura AR pueden reemplazar fácilmente y sin inconvenientes la levadura de panadería en todos los procesos de panificación existentes ya que no se requieren cambios en los procesos de panificación industriales a fin de usar la levadura AR, ya sea para la producción de pan o cualquier producto horneado fermentado con levadura.

Tal como se describe en este informe, las cepas de levadura de panadería AR adaptativamente evolucionadas y no modificadas genéticamente, que expresan en forma constitutiva la Asparaginasa II asociada a pared celular (*ASP3*) (Figuras 2, 5 y 6) representan una

solución contundente y altamente eficaz para el problema de la AA en los alimentos. Las cepas de levadura AR son capaces de reducir sustancialmente los niveles de asparagina en una variedad de alimentos en un porcentaje de hasta 95% con mínimo tiempo de exposición y cambio en el procesamiento (Figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18). En los alimentos en los cuales la levadura ya es un ingrediente, no es necesario un cambio en su procesamiento.

Al degradar sustancialmente la asparagina en los productos alimenticios antes de la cocción, la tecnología evita la formación de AA independientemente de las prácticas del manejo de alimentos en las etapas finales del proceso; es decir, las cepas AR reducen el potencial de AA de los alimentos. Esto elude la necesidad de una estrategia de control y reducción de AA de múltiples aristas -que implica un vasto intervalo de parámetros y representa intervención a gran escala- que es logística y técnicamente difícil de implementar, extremadamente costosa, y difícil de reglamentar (por ejemplo, en la preparación de alimentos en restaurantes y en el hogar).

En resumen, se empleó evolución adaptativa para desarrollar cepas de levadura de panadería no GMO novedosas que en forma constitutiva expresan la asparaginasa asociada a la pared celular II (*ASP3*) y degradan la L-asparagina para reducir los niveles de AA en una amplia variedad de productos alimenticios comunes. Las cepas AR son capaces de reducir los niveles de AA en el pan y otros alimentos fermentados con levadura, alimentos a base de papa,

alimentos extruidos como refrigerios, galletitas dulces, panes entrelazados, y café en un porcentaje de hasta 95 %.

Si bien la presente invención ha sido descrita con referencia a lo que se consideran en la presente como ejemplos, ha de entenderse
5 que la invención no se limita a los ejemplos divulgados. Por el contrario, la invención está destinada a cubrir diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones que siguen.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes se
10 incorporan en la presente por referencia en su totalidad al mismo punto que si se hubiese indicado que cada publicación, patente o solicitud de patente individual está incorporada por referencia en su totalidad.

15

20

25

Referencias

1. **Besaratinia A, Pfeifer GP.** 2007. *A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. Carcinogenesis* **28**:519–528.
2. **Exon JH.** 2006. *A Review of the Toxicology of Acrylamide. Journal of Toxicology and Environmental Health, Parte B* **9**:397–412.
3. **Capuano E, Fogliano V.** 2011. *Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. LWT - Food Science and Technology* **44**:793–810.
4. **Shipp A, Lawrence G, Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C.** 2006. *Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. Crit. Rev. Toxicol.* **36**:481– 608.
5. **Besaratinia A, Pfeifer GP.** 2004. *Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. J. Natl. Cancer Inst* **96**:1023–1029.
6. **Rice JM.** 2005. *The carcinogenicity of acrylamide. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **580**:3–20.
7. **Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT.** 2002. *Acrylamide is formed in the Maillard reaction. Nature* **419**:448–449.
8. **Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA.** 2002. *Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products. Nature* **419**:449–450.

9. **Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M.** 2002. *Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:4998–5006.
- 5 10. **Normandin L, Bouchard M, Ayotte P, Blanchet C, Becalski A, Bonvalot Y, Phaneuf D, Lapointe C, Gagné M, Courteau M.** 2013. *Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. Food and Chemical Toxicology* **57**:75–83.
- 10 11. **Chen Y-H, Xia E-Q, Xu X-R, Ling W-H, Li S, Wu S, Deng G-F, Zou Z-F, Zhou J, Li H-B.** 2012. *Evaluation of Acrylamide in Food from China by a LC/MS/MS Method. IJERPH* **9**:4150–4158.
- 15 12. **Wenzl T, Anklam E.** 2007. *European Union database of acrylamide levels in food: Update and critical review of data collection. Food Additives and Contaminants* **24**:5–12.
- 20 13. **Mojska H, Gielecińska I, Szponar L, Ołtarzewski M.** 2010. *Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population. Food and Chemical Toxicology* **48**:2090–2096.
- 25 14. **Tran NL, Barraj LM, Murphy MM, Bi X.** 2010. *Dietary Acrylamide Exposure and Hemoglobin Adducts “National Health and Nutrition Examination Survey (2003–04). Food and Chemical Toxicology* **48**:3098–3108.
15. **Sirot VR, Hommet F, Tard A, Leblanc J-C.** 2012. *Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the*

second French Total Diet Study. Food and Chemical Toxicology
50:889–894.

16. Zhou PP, Zhao YF, Liu HL, Ma YJ, Li XW, Yang X, Wu YN. 2013. *Dietary exposure of the Chinese population to*
 5 *acrylamide. Biomed. Environ. Sci.* **26**:421–429.

17. Mojska H, Gielecińska I, Stoś K. 2012.
Determination of acrylamide level in commercial baby foods and an
assessment of infant dietary exposure. Food and Chemical
 10 *Toxicology* **50**:2722–2728.

18. Cengiz MF, Gündüz CPB. 2013. *Acrylamide*
exposure among Turkish toddlers from selected cereal-based baby
food samples. Food and Chemical Toxicology **60**:514–519.

19. Bent G-A, Maragh P, Dasgupta T. 2012. *Acrylamide*
 15 *in Caribbean foods – Residual levels and their relation to reducing*
sugar and asparagine content. Food Chemistry **33**:451–457.

20. Pelucchi C, Bosetti C, Galeone C, La Vecchia C.
 2014. *Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-*
 20 *analysis. Int. J. Cancer* **136**:2912–2922.

21. Jackson LS, Al-Taher F. 2005. *Effects of consumer*
food preparation on acrylamide formation. Advances in Experimental
Medicine and Biology **561**:447–465.

22. **Fredriksson H, Tallving J, Rosén J, Åman P.** 2004. *Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread. Cereal Chemistry* **81**:650–653.
- 5 23. **Bråthen E, Kita A, Knutsen SH, Wicklund T.** 2005. *Addition of Glycine Reduces the Content of Acrylamide in Cereal and Potato Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:3259–3264.
- 10 24. **Fink M, Andersson R, Rosén J, Åman P.** 2006. *Effect of Added Asparagine and Glycine on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Bread. Cereal Chemistry* **83**:218– 222.
25. **Gökmen V, Palazoğlu TK.** 2007. *Acrylamide Formation in Foods during Thermal Processing with a Focus on Frying. Food Bioprocess Technol* **1**:35–42.
- 15 26. **Amrein TM, Schönbächler B, Escher F, Amadò R.** 2004. *Acrylamide in Gingerbread: Critical Factors for Formation and Possible Ways for Reduction. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:4282–4288.
- 20 27. **Claus A, Schreiter P, Weber A, Graeff S, Herrmann W, Claupein W, Schieber A, Carle R.** 2006. *Influence of Agronomic Factors and Extraction Rate on the Acrylamide Contents in Yeast-Leavened Breads. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:8968–8976.

- 28. Claus A, Mongili M, Weisz G, Schieber A, Carle R.** 2008. *Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. Journal of Cereal Science* **47**:546–554.
- 5 **29. Chawla R, Shakya R, Rommens CM.** 2012. *Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. Plant Biotechnology Journal* **10**:913–924.
- 10 **30. Ye J, Shakya R, Shrestha P, Rommens CM.** 2010. *Tuber-Specific Silencing of the Acid Invertase Gene Substantially Lowers the Acrylamide-Forming Potential of Potato. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:12162–12167.
- 15 **31. Rommens CM, Yan H, Swords K, Richael C, Ye J.** 2008. *Low-acrylamide French fries and potato chips. Plant Biotechnology Journal* **6**:843–853.
- 20 **32. Cooper TG.** 1982. *Nitrogen metabolism in S. cerevisiae*, pags. 39–99. In J.N. Strathern, EWJ (ed.), *The molecular biology of the yeast: metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Press, New York.*
- 25 **33. Jones GE.** 1977. *Genetic and physiological relationships between L-asparaginase I and asparaginase II in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology* **130**:128–130.

34. **League GP, Slot JC, Rokas A.** 2012. *The ASP3 locus in Saccharomyces cerevisiae originated by horizontal gene transfer from Wickerhamomyces. FEMS Yeast Research* **12**:859–863.
- 5 35. **Sinclair K, Warner JP, Bonthron DT.** 1994. *The ASP1 gene of Saccharomyces cerevisiae, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. Gene* **144**:37–43.
36. **Kim KW, Kamerud JQ, Livingston DM, Roon RJ.** 1988. *Asparaginase II of Saccharomyces cerevisiae. Characterization of the ASP3 gene. Journal of Biological Chemistry* **263**:11948–11953.
- 10 37. **Dunlop PC, Meyer GM, Roon RJ.** 1980. *Nitrogen catabolite repression of asparaginase II in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology* **143**:422–426.
- 15 38. **Huang Y-C, Chen H-T, Teng S-C.** 2010. *Intragenic transcription of a noncoding RNA modulates expression of ASP3 in budding yeast. RNA (New York, N.Y.)* **16**:2085–2093.
39. **Pauling KD, Jones GE.** 1980. *Asparaginase II of Saccharomyces cerevisiae: Dynamics of Accumulation and Loss in Rapidly Growing Cells. J. Gen. Microbiol.* **117**:423–430.
- 20 40. **Roon RJ, Murdoch M, Kunze B, Dunlop PC.** 1982. *Derepression of asparaginase II during exponential growth of Saccharomyces cerevisiae on ammonium ion. Arch. Biochem. Biophys.* **219**:101–109.
- 25

- 41. Ferrara MA, Mattoso JMV, Bon EPS, Pereira N.** 2004. *Kinetics of asparaginase II fermentation in Saccharomyces cerevisiae ure2dal80 mutant: effect of nitrogen nutrition and pH. Applied Biochemistry and Biotechnology* **113-116**:299–305.
- 5 **42. Hofman-Bang J.** 1999. *Nitrogen catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae. Molecular biotechnology* **12**:35–73.
- 43. Derkx PM, Janzen T, Sørensen KI, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Johansen E.** 2014. *The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology. Microb. Cell Fact.* **13**:S5.
- 10 **44. Pedersen MB, Iversen SL, Sørensen KI, Johansen E.** 2005. *The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews* **29**:611–624.
- 15 **45. Margolles A, Sanchez B.** 2012. *Selection of a Bifidobacterium animalis subsp. lactis Strain with a Decreased Ability To Produce Acetic Acid. Applied and Environmental Microbiology* **78**:3338–3342.
- 20 **46. Saarela M, Alakomi HL, Mättö J, Ahonen AM, Puhakka A, Tynkkynen S.** 2011. *Improving the storage stability of Bifidobacterium breve in low pH fruit juice. International Journal of Food Microbiology* **149**:106–110.

47. **Smith J, van Rensburg E, Görgens JF.** 2014. *Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase.* *BMC Biotechnol.* **14**:41.
48. **Bachmann H, Starrenburg MJC, Molenaar D, Kleerebezem M, van Hylckama Vlieg JET.** 2012. *Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution.* *Genome research* **22**:115–124.
49. **guez JOV-R, Shi S, Siewers V, Nielsen J.** 2014. *Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid ethyl esters, an advanced biofuel, by eliminating non-essential fatty acid utilization pathways.* *APPLIED ENERGY* **115**:226–232.
50. **Callanan MJ, Beresford TP, Ross RP.** 2005. *Genetic Diversity in the Lactose Operons of *Lactobacillus helveticus* Strains and Its Relationship to the Role of These Strains as Commercial Starter Cultures.* *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1655–1658.
51. **Çakar ZP, Turanlı-Yıldız B, Alkım C, Yılmaz Ü.** 2011. *Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties.* *FEMS Yeast Res* **12**:171–182.

52. **Winkler JD, Kao KC.** 2014. *Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. Genomics* **104**:406–411.

53. **Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Rogers P, Stanley GA.** 2009. *Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of Saccharomyces cerevisiae. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **37**:139–149.

54. **Liu E, Hu Y.** 2010. *Construction of a xylose-fermenting Saccharomyces cerevisiae strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. Biochemical Engineering Journal* **48**:204–210.

55. **Stroman P, Muller CC, Sorensen KI.** 2003. *Heat Shock Treatment Increases the Frequency of Loss of an Erythromycin Resistance-Encoding Transposable Element from the Chromosome of Lactobacillus crispatus CHCC3692. Applied and Environmental Microbiology* **69**:7173–7180.

56. **Dragosits M, Mattanovich D.** 2013. *Adaptive laboratory evolution principles and applications for biotechnology. Microb. Cell Fact.* **12**:1–1.

57. **Gresham D, Usaite R, Germann SM, Lisby M, Botstein D, Regenberg B.** 2010. *Adaptation to diverse nitrogen-limited environments by deletion or extrachromosomal element formation of the GAP1 locus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:18551–18556.

58. Hong J, Gresham D. 2014. *Molecular Specificity, Convergence and Constraint Shape Adaptive Evolution in Nutrient-Poor Environments. PLoS genetics* **10**:e1004041–16.

5 **59. WATANABE T, IEFUJI H, KITAMOTO HK.** 2013. *Genome-wide screening to study breeding methods to improve the nitrogen accumulation ability of yeast without gene recombinant techniques. Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **77**:917–922.

10 **60. Kamerud JQ, Roon RJ.** 1986. *Asparaginase II of Saccharomyces cerevisiae: selection of four mutations that cause derepressed enzyme synthesis. Journal of Bacteriology* **165**:293–296.

61. Tristezza M, Gerardi C, Logrieco A, Grieco F. 2009. *An optimized protocol for the production of interdelta markers in Saccharomyces cerevisiae by using capillary electrophoresis. Journal of Microbiological Methods* **78**:286–291.

15

62. Hoffman CS, Winston F. 1987. *A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. Gene* **57**:267–272.

20

63. Köhrer K, Domdey H. 1991. *Preparation of high molecular weight RNA. Methods in enzymology* **194**:398–405.

64. Dunlop PC, Roon RJ, Even HL. 1976. *Utilization of D-asparagine by Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology* **125**:999–1004.

25

65. **Roon RJ, Even HL, Dunlop P, Larimore FL.** 1975. *Methylamine and ammonia transport in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology* **122**:502–509.
66. **Roon RJ, Levy JS, Larimore F.** 1977. *Negative interactions between amino acid and methylamine/ammonia transport systems of Saccharomyces cerevisiae. Journal of Biological Chemistry* **252**:3599–3604.
67. **Keramat J, LeBail A, Prost C, Jafari M.** 2010. *Acrylamide in Baking Products: A Review Article. Food Bioprocess Technol* **4**:530–543.
68. **Capuano E, Ferrigno A, Acampa I, Serpen A, Açar ÖÇ, Gökmen V, Fogliano V.** 2009. *Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. FRIN* **42**:1295–1302.
69. **Surdyk N, Rosén J, Andersson R, Åman P.** 2004. *Effects of Asparagine, Fructose, and Baking Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread. Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:2047–2051.
70. **Halford NG, Curtis TY, Muttucumaru N, Postles J, Elmore JS, Mottram DS.** 2012. *The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. Journal of Experimental Botany* **63**:2841–2851.
71. **Ljungdahl PO, Daignan-Fornier B.** 2012. *Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in Saccharomyces cerevisiae. Genetics* **190**:885–929.