

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 555**

51 Int. Cl.:

C12P 19/26 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

C07H 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2011 PCT/ES2011/070403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12168495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2011 E 11867262 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2722394**

54 Título: **Obtención de oligosacáridos mediante un proceso biotecnológico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.06.2018

73 Titular/es:

**HERO AG (100.0%)
Karl Roth-Strasse 8
5600 Lenzburg, CH**

72 Inventor/es:

**MATENCIO HILLA, ESTHER;
NAVARRO BARRERA, VERÓNICA;
ENRIQUE LÓPEZ, MARÍA;
TORTAJADA SERRA, MARTA;
LUKOVIC, DUNJA;
RODRÍGUEZ JIMENEZ, DIEGO;
RAMÓN VIDAL, DANIEL y
ÁLVAREZ PÉREZ, BEATRIZ**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 671 555 T3

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

Obtención de oligosacáridos mediante un proceso biotecnológico

DESCRIPCIÓN**5 Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a la obtención de oligosacáridos específicos presentes en la leche materna, concretamente la lacto-N-neotetraosa y la lacto-N-tetraosa, mediante un proceso biotecnológico.

10 Antecedentes de la invención

Los oligosacáridos son carbohidratos de cadena corta (grado de polimerización de 2 a 7) que se encuentran de forma natural en frutas, verduras, leche humana y miel. Son considerados importantes debido a sus propiedades biológicas y fisiológicas, como ingredientes funcionales y particularmente por su actividad prebiótica.

15 Los oligosacáridos presentes en la leche humana cumplen un papel biológico importante ya que probablemente están relacionados con la prevención de infecciones en los recién nacidos al evitar la adhesión de ciertos patógenos (virus y bacterias) al epitelio intestinal, disparar el sistema inmunitario localmente y actuar como prebióticos.

20 La leche materna contiene más de 130 oligosacáridos distintos lo que hace que sean el tercer componente más abundante de ésta. Su concentración total disminuye a medida que avanza la lactancia, de modo que después de un año contiene menos de la mitad de la cantidad de oligosacáridos que en las primeras semanas de vida. Existen diferencias cuantitativas y cualitativas entre los oligosacáridos detectados en la leche de los distintos mamíferos. Los monómeros más abundantes de los oligosacáridos de la leche humana son la D-glucosa, D-galactosa, N-acetil glucosamina, L-fucosa y el ácido N-acetil neuramínico. Todos ellos sufren modificaciones por la adición de grupos de L-fucosa y/o ácido siálico, generando los llamados oligosacáridos neutros o ácidos, respectivamente, de los que se han descrito entre 150 y 200. Su concentración en la leche disminuye a medida que avanza la lactancia, sin embargo, en los primeros meses, parecen tener un papel fisiológico relevante.

30 Los oligosacáridos neutros más importantes se forman a partir de la lactosa mediante glucosiltransferasas (GT), de modo que los oligosacáridos neutros más abundantes formados en la leche humana son la lacto-N-triosa y la lacto-N-tetraosa y los distintos isómeros de la lacto-N-fucopentaosa. La fracción de oligosacáridos no digerida en la leche materna estimula el crecimiento de bifidobacterias en el colon, y esta flora puede tener efectos beneficiosos para la protección contra infecciones entéricas. Por lo tanto, los oligosacáridos son un componente principal del sistema inmunitario innato por el cual una madre protege a su hijo de patógenos (patógenos entéricos o que afectan a otra localización) durante la lactancia.

35 Es destacable que ninguno de estos productos se encuentra en la leche de cabra, oveja o vaca. Además, estas moléculas no están presentes en las leches artificiales, por lo que su adición a las mismas tiene evidente interés social y económico. En este sentido existirían cuatro posibilidades para su producción y posterior utilización.

i) La primera sería su purificación a partir de la leche humana. Esta alternativa resulta inabordable dada la carencia de materia prima.

ii) La segunda sería la síntesis química. Aunque es posible, su coste es alto y su eficacia baja.

45 iii) La tercera alternativa se basa en el uso de enzimas para producir distintos oligosacáridos a partir de lactosa. Esta estrategia se basa en el uso de distintas glicosidasas o glicosiltransferasas provenientes de diversos orígenes (microorganismos o mamíferos). Se prefiere el uso de glicosiltransferasas dada su mayor eficacia, sin embargo dado que muchas de ellas provienen de mamíferos, su coste es muy elevado. Por lo tanto se está trabajando en la expresión de genes que codifican una de estas enzimas en distintos microorganismos (*Escherichia coli*, *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*) con el fin de sobreproducirlos, aunque esta estrategia nunca ha alcanzado la escala semi-industrial.

50 iv) Finalmente, la última estrategia incluye la construcción de microorganismos capaces de generar los oligosacáridos mediante técnicas de ingeniería genética. En este sentido se han logrado los primeros avances expresando tres genes de *Neisseria meningitidis* que codifican una N-acetil glucosaminotransferasa, una galactosil transferasa y una sialil transferasa, en una cepa de *E.coli* en la que la expresión del gen que codifica el transportador de la lactosa puede inducirse por glicerol. Aunque esta estrategia ha tenido éxito, la comercialización del producto obtenido para la alimentación infantil parece compleja al utilizarse bacterias patógenas como donadoras y receptoras de genes y generar los ingredientes obtenidos a partir de organismos genéticamente modificados que requerirían un etiquetado específico. También se han construido con éxito diferentes bacterias transgénicas que, cuando se cultivan en un fermentador y se permeabilizan, son capaces de producir cada una de ellas diferentes actividades enzimáticas y precursores implicados en la síntesis de los oligosacáridos de interés. Dicha estrategia implica cuatro microorganismos distintos dificultando su posible aplicación industrial.

Respecto al estado de la técnica descrito en documentos de patente, existen procesos anteriores, tales como, por ejemplo, los del documento JP 11253191 A, que proporciona un método para sintetizar enzimáticamente lacto-N-tetraosa, adecuada para su uso en alimentos y medicamentos, en cualquier cantidad. El método comprende la reacción de UDP-GlcNAc en lactosa en presencia de beta-1,3-N-acetilglucosaminil transferasa para sintetizar lacto-N-triosa seguido de unión con galactosa en presencia de beta-1,3-N-acetilglucosaminil transferasa para sintetizar lacto-N-tetraosa.

El documento US 2007/0275881 A1 se refiere a composiciones farmacéuticas y a su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Las composiciones contienen péptidos unidos a oligosacáridos de interés, tales como, lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa. Se describe la obtención de estos oligosacáridos en levaduras en presencia de las correspondientes glicosiltransferasas.

La invención del documento US 7.521.212 B1 se refiere a la producción de oligopolisacáridos a través de un proceso microbiológico, en el cual, por ejemplo, se obtiene lactosa-N-neotetraosa, en presencia de lactosa y GlcNAc y las enzimas beta-1-3-N-acetilglucosaminiltransferasa y beta-1-4-galactosiltransferasa. Se describe también la obtención del producto intermedio lacto-N-triosa.

El documento US 6.204.431 B1 se refiere a métodos para producir mamíferos no humanos transgénicos capaces de producir ciertos oligosacáridos en su leche. A los efectos de la invención descrita en el citado documento, se seleccionan las secuencias genéticas de enzimas, tales como beta-acetilglucosaminiltransferasa, a partir de especies eucariotas o procariotas y se insertan en el pronúcleo del embrión que dará lugar al animal transgénico.

El documento ES 2 162 619 T3 describe un aparato y un método para la obtención de composiciones de oligosacáridos en tres etapas, utilizando glucosaminiltransferasas y galactosiltransferasas humanas y el documento US 5.879.912 describe un método para sintetizar oligosacáridos, polisacáridos, glicolípidos y glicoproteínas. El documento describe la síntesis de lacto-N-neotetraosa en presencia de dos cultivos celulares que proporcionan dos enzimas con actividad glicosiltransferasa para formar los enlaces beta-Gal 1-4 GlcNAc y beta-GlcNAc 1-3 en presencia de UPD-GlcNAc y lactosa.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere al desarrollo de un método de producción biotecnológico para producir oligosacáridos específicos presentes en la leche materna, concretamente para producir los oligosacáridos lacto-N-neotetraosa y lacto-N-tetraosa, a partir de lacto-N-triosa obtenida de sobrenadantes de cultivo enriquecidos con las enzimas adecuadas para generarlos a partir de sus precursores: lactosa y N-acetil-glucosamina.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la formación enzimática de los oligosacáridos: lacto-N-triosa, lacto-N-neotetraosa y lacto-N-tetraosa.

La figura 2 muestra el ensayo en placa de la detección de la actividad N-acetil-glucosaminidasa. (Ejemplo 3).

La figura 3 muestra el efecto de la temperatura y del medio de cultivo sobre la actividad de la enzima nagA de *A. niger* recuperada del caldo de cultivo de la cepa recombinante de *S. cerevisiae* (Ejemplo 4).

La figura 4 muestra la determinación de la actividad beta-galactosidasa en caldo de cultivo (A) o suspensión celular (B) de recombinantes de *S. cerevisiae* o *P. pastoris* para la enzima lacZ de *S. thermophilus* (Ejemplo 5).

La figura 5 muestra la localización subcelular de lacZ de *S. thermophilus* sobreexpresada en *S. cerevisiae* (Ejemplo 6).

La figura 6 muestra el ensayo en placa de la detección de actividad beta-galactosidasa en transformantes de *E. coli* para el gen lacZ de *S. thermophilus* (Ejemplo 7).

La figura 7 muestra el proceso de obtención de lacto-N-triosa en caldo de cultivo (Ejemplo 8).

La figura 8 muestra la influencia de la concentración de sustratos sobre la producción de lacto-N-triosa en caldo de cultivo (Ejemplo 9).

La figura 9 muestra el proceso de obtención de lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa en dos etapas secuenciales (Ejemplo 10).

Descripción detallada de la invención

El método de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas 1-9.

Es decir, la invención se refiere a un método para producir lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa, que comprende llevar a cabo una reacción utilizando al menos un cultivo de levaduras genéticamente modificadas que proporcionan las actividades de las enzimas responsables de la producción de lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa a partir de la lactosa, que comprende:

a) añadir lactosa y N-acetilglucosamina en presencia de beta-(1,3)-N-acetilglucosaminiltransferasa para formar lacto-N-triosa, y
 b) añadir galactosa en presencia de beta-galactosiltransferasa para formar lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa,
 c) permitir la acumulación de lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa, y
 d) recuperar lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa de dicha mezcla de reacción, caracterizado porque
 las enzimas necesarias para producir la lacto-N-triosa, y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa, se producen por levaduras genéticamente modificadas de la especie *S. cerevisiae*, que llevan un vector recombinante que comprende el gen *nagA* de *Aspergillus niger* SEQ ID NO: 1 que expresa una enzima con actividad beta-1-3- N-acetilglucosaminiltransferasa y un vector recombinante que comprende el gen *lacZ* de *Streptococcus thermophilus* SEQ ID NO: 2 que expresa una enzima con actividad beta-galactosiltransferasa.

Los oligosacáridos a obtener en la presente invención son los tetrasacáridos lacto-N-neotetraosa y lacto-N-tetraosa. Estos tetrasacáridos están presentes en la leche materna, y están formados por una unidad de lactosa a la que se añade N-acetilglucosamina (enlace beta 1-3), lo que genera lacto-N-triosa. A partir de lacto-N-triosa, y en presencia de beta-galactosiltransferasa, puede obtenerse lacto-N-neotetraosa (enlace beta 1-4) y lacto-N-tetraosa (enlace beta 1-3). Por lo tanto, los tetrasacáridos se producen mediante dos actividades secuenciales, una actividad beta-(1,3)-N-acetilglucosaminiltransferasa, y después, una actividad beta-(1,3) o beta-(1,4) galactosiltransferasa.

El método sigue el esquema simplificado de las reacciones de transglicosilación enzimáticas necesarias para la síntesis de los oligosacáridos de interés, es decir, lacto-N-neotetraosa y lacto-N-tetraosa, así como lacto-N-triosa como un producto intermedio (Figura 1).

Las enzimas necesarias para producir los oligosacáridos lacto-N-triosa, lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa, son producidas y secretadas al caldo de cultivo por levaduras de la especie *S. cerevisiae* modificadas genéticamente. Para utilizar un microorganismo que produzca enzimas para el consumo humano, se deben de cumplir una serie de requisitos legales que se centran en la obligación de que dicho microorganismo figure en la lista denominada "GRAS" (*generally acknowledged as secure, generalmente* considerado como seguro), es decir, que cumpla ciertos requisitos de seguridad. Existen aproximadamente 50 microorganismos GRAS aprobados para la industria alimentaria. En la presente invención, los genes que codifican ambas actividades enzimáticas se originan de microorganismos GRAS para evitar problemas de rechazo. Los genes seleccionados son: *nagA* de *Aspergillus niger* y *lacZ* de *Streptococcus thermophilus*.

Se ha demostrado que la actividad enzimática necesaria para la primera etapa del proceso está presente en suero bovino, calostro, y las enzimas codificadas por los genes *nagA* de los hongos *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus nidulans* (dos enzimas con actividad N-acetil-glucosaminidasa).

Debido a la similitud con las especies en las que se han identificado genes codificantes de glucosaminiltransferasas (Matsuo 2003), a la disponibilidad pública de su secuencia y a su estatus GRAS, el hongo *A. niger* se selecciona como origen de esta actividad enzimática para utilizar en el proceso objeto de la invención. Cabe señalar que, aunque esta actividad se ha detectado en la especie *A. niger*, el gen correspondiente no se ha identificado en su secuencia genómica. Por lo tanto, para el propósito de la presente invención, fue necesario identificar primero en *A. niger* el gen que es ortólogo al gen *nagA* de *A. nidulans*. La secuencia nucleotídica del gen *nagA* de *A. niger* se muestra en SEQ ID NO: 1.

La segunda etapa se llevó a cabo por una enzima galactosiltransferasa. Esta actividad se ha demostrado en algunas beta-galactosidasas bacterianas y fúngicas (*A. oryzae*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus circulans*).

En este caso, como origen de la actividad galactosiltransferasa que se utilizará en el proceso objeto de la invención, se ha seleccionado el gen que codifica la enzima beta-galactosidasa (*lacZ*) de la bacteria *S. thermophilus* porque dicho gen codifica esta actividad en otras bacterias lácticas, y porque se sabe que *S. thermophilus* es capaz de catalizar reacciones de transglicosilación al actuar en lactosa (Smart 1991, Reuter *et al* 1999). El gen *lacZ* se identifica en la secuencia genómica de *S. thermophilus* y se ilustra en la SEQ ID NO: 2.

Por otra parte, para que *S. cerevisiae* segregue las enzimas clonadas en el caldo de cultivo, es necesario fusionarlas con un péptido señal de secreción. Los tres péptidos señal de secreción más ampliamente estudiados para *S. cerevisiae* son, el péptido señal de secreción del factor α (Brake *et al.* 1989), SEQ ID NO: 3, el péptido señal de secreción de invertasa SUC2 (Perlman *et al.* 1982), SEQ ID NO: 4 y el péptido señal de secreción de la fosfatasa ácida PHO5 (Arima *et al.* 1983), SEQ ID NO: 5.

Por lo tanto, los genes que codifican las enzimas *nagA* y *lacZ* pueden expresarse en transformantes de *S. cerevisiae* que pueden obtenerse insertando el ADN en dos vectores e introduciendo dichos vectores en un hospedador. Los

- primeros métodos de transformación de *S. cerevisiae* implicaban la eliminación de la pared celular para producir esferoplastos que pudieran incorporar ADN tras tratamiento de los mismos con calcio y polietilenglicol (Hinnen *et al.* 1978). Los transformantes se sembraban en placas en medio selectivo isotónico para la regeneración de la pared celular. Posteriormente se desarrolló un método más práctico en el que células intactas se hacen competentes por tratamiento con iones de litio (Ito *et al.* 1983). Este método se utiliza actualmente a pesar de ser menos eficaz que el anterior; sin embargo, una modificación que utiliza DMSO permite un incremento de hasta 25 veces de la frecuencia de transformación. Más recientemente, se ha utilizado un tercer método, la electroporación, obteniéndose eficacias muy elevadas (Meilhoc *et al.* 1990).
- Los vectores a usar para este propósito pueden ser cualquiera que pueda expresar los genes que codifican las enzimas en hospedadores apropiados. Como ejemplo de dichos vectores se incluyen: vectores plasmídicos, bacteriófagos o cósmidos. Generalmente, dichos vectores comprenderán un factor regulador, tal como un promotor; a corta distancia del promotor deben tener una región que al transcribirse suministre el sitio de entrada al ribosoma; y finalmente deben contener un origen de replicación que permita su multiplicación en el hospedador. Además, los vectores seleccionados para cada proteína tienen genes marcadores de selección diferentes con el fin de rescatar diferentes auxotrofias, lo que permite la introducción simultánea de ambos vectores en un mismo hospedador y selección en una sola etapa. Los marcadores de selección más ampliamente utilizados para *S. cerevisiae* son LEU2, TRP1, URA3 y HIS3, utilizados en las correspondientes cepas mutantes que son auxótrofas para leucina, triptófano, uracilo e histidina, respectivamente (Beggs 1978; Rose *et al.* 1984; Struhl *et al.* 1980; Tschumper *et al.* 1980). Dichas cepas auxótrofas están disponibles y su selección requiere el uso de medio mínimo de crecimiento en ausencia del nutriente relevante. Como fuentes de obtención de dichas cepas pueden mencionarse las siguientes colecciones de cultivos tipo: Yeast Genetics Stock Culture Center of the American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/YeastGeneticStock.cfm>); EUROSCARF (http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/col_index.html); Research Genetics (<http://www.resgen.com/products/YEASTD.php3>); National Collection of Yeast Cultures (<http://www.ncyc.co.uk/Sacchgen.html>); Centraalbureau voor Schimmelcultures (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP>) y Culture Collection of *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.natur.cuni.cz/fccm/federacs.htm#dgub>).
- Como hospedadores en los que se introduce un vector de expresión que contiene el ADN, pueden mencionarse los siguientes: cultivos de levaduras, bacterias y células de insecto, mamífero, etc. Se prefiere el uso de la levadura *S. cerevisiae*, pero también se propone *Schizosaccharomyces pombe*, *P. pastoris*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. thermophilus*, etc.
- Para comprobar la expresión del gen *nagA* en el hospedador, es posible ensayar la actividad hidrolítica N-acetilglucosaminidasa de la enzima expresada en los transformantes obtenidos, mediante un ensayo en placa o en medio líquido, utilizando los sustratos sintéticos metilumbeliferil (MU)-N-acetilglucosamina o p-nitrofenil (PNP)-N-acetilglucosamina, respectivamente (Borooah *et al.* 1961). En el caso del ensayo en placa, la formación de metilumbeliferona, como resultado de la actividad hidrolítica N-acetilglucosaminidasa, se detecta cualitativamente mediante análisis de fluorescencia con luz UV. La metilumbeliferona es un compuesto fluorogénico, fluorescente al iluminarse con una lámpara de luz UV de 366 nm. El ensayo en medio líquido permite cuantificar la actividad analizando la absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, como resultado de la actividad hidrolítica N-acetilglucosaminidasa.
- De la misma manera, para comprobar la expresión del gen *lacZ*, es posible ensayar la actividad hidrolítica beta-galactosidasa de la enzima expresada en los transformantes obtenidos, mediante un ensayo en placa o en medio líquido, con los sustratos sintéticos metilumbeliferil (MU)-galactósido o p-nitrofenil (PNP)-galactopiranosido, respectivamente (Maruhn 1976). En el caso del ensayo en placa, la formación de metilumbeliferona como resultado de la actividad hidrolítica beta-galactosidasa, se detecta cualitativamente mediante análisis de fluorescencia con luz UV. La metilumbeliferona es un compuesto fluorogénico, fluorescente al iluminarse con una lámpara de luz UV de 366 nm. El ensayo en medio líquido permite cuantificar la actividad analizando la absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, como resultado de la actividad hidrolítica beta-galactosidasa.
- El ensayo de placa permite una selección rápida de aquellos clones con mayor expresión génica. Por otro lado, el ensayo en medio líquido permite cuantificar la actividad así como la secreción ya que la actividad en el caldo de cultivo y en las células aisladas se analiza de forma independiente.
- Una vez comprobada la actividad de las enzimas recombinantes seleccionadas, es posible expresarlas simultáneamente en una misma cepa utilizando plásmidos que rescaten distintas auxotrofias. Como plásmidos a utilizar pueden ser los pertenecientes a la colección descrita en Mumberg *et al.* (1995), formada por series de vectores de expresión con las combinaciones de cuatro promotores, dos orígenes de replicación y cuatro marcadores diferentes. Utilizando estos vectores, es posible controlar la expresión génica a diferentes niveles,

controlando el nivel de transcripción así como el número de copias del gen recombinante.

Una vez seleccionados los transformantes con mayor actividad de cada enzima o con actividades simultáneas en una misma cepa, es posible hacerlos crecer a alta densidad obteniendo caldos de cultivo con actividades enzimáticas elevadas o grandes cantidades de células con actividad intracelular en el caso de que la enzima no se secrete. Estos caldos de cultivo o extractos celulares se pueden utilizar directamente como lecho de reacción para la obtención de los oligosacáridos de interés a partir de sus precursores lactosa y N-acetil-glucosamina, sin necesidad de purificar las proteínas correspondientes. Como alternativa, las enzimas pueden purificarse para su uso en la obtención de los oligosacáridos de interés.

Por tanto, el proceso final de obtención de los oligosacáridos de interés constará de dos fases, una primera que durará de 70 a 74 horas a 43-47 °C, preferiblemente, 72 horas a 45 °C, en la cual se generará lacto-N-triosa a partir de sus precursores lactosa y N-acetil-glucosamina, utilizando la actividad nagA de caldos de cultivo o extractos celulares (en caso de que la proteína se secrete o no, respectivamente) o la proteína purificada. Finalizada esta fase, es posible purificar la lacto-N-triosa o continuar el proceso con una segunda fase para generar lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa. Esta segunda fase durará 36 horas a 45 °C en la cual se generará lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa a partir de lacto-N-triosa y galactosa, presentes en el caldo de reacción resultante de la primera fase, utilizando la actividad lacZ de un caldo de cultivo o extracto celular, según se secrete o no la enzima recombinante, o en su caso, la proteína purificada. Preferente, el método de obtención de lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa se ha realizado de forma que la lacto-N-tetraosa y la lacto-N-neotetraosa se obtienen en un intervalo de 1 a 100 gramos por litro de caldo de reacción en dos etapas secuenciales a partir de caldo de cultivo rico en actividad nagA y de extracto celular con actividad lacZ, provenientes de una sola cepa que expresa y secreta nagA y que expresa y no secreta lacZ.

Para el propósito de la presente invención, se contempla también la posibilidad de llevar a cabo la reacción utilizando la actividad de las dos enzimas simultáneamente presentes en un mismo caldo de cultivo o en un mismo extracto celular con actividad lacZ, proveniente de una sola cepa que expresa y secreta nagA y lacZ.

Finalmente, los oligosacáridos obtenidos de acuerdo a la presente invención se extraen y purifican del medio de reacción a través de técnicas habituales conocidas del estado de la técnica. Como técnica preferida de purificación de oligosacáridos se utiliza la separación cromatográfica en carbón vegetal (Whistler *et al.* 1950).

Una vez purificados, estos oligosacáridos pueden incorporarse como ingredientes alimenticios en productos alimenticios para su consumo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Secuencia de nucleótidos del gen *nagA* de *A. niger* (Figura 2)

El gen que codifica la actividad N-acetil-glucosaminidasa en *A. niger* se identificó por homología con el gen *nagA* de *A. nidulans*. La secuencia de dicho gen de referencia está disponible y anotada en las bases de datos (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_group) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=10039359>). La proteína resultante de su expresión se corresponde con la SEQ ID NO: 6.

Al comparar la secuencia de aminoácidos anterior con el genoma de *A. niger* disponible en las bases de datos (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni1/Aspni1.home.html>), hay al menos 2 posibles genes que son ortólogos al gen *nagA* de *A. nidulans*. De los dos, se clona el gen cuya secuencia es SEQ ID NO: 1, debido a su mayor homología y a su descripción en las bases de datos como un gen que codifica una supuesta actividad N-acetil-glucosaminidasa. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos codificadas por ambos genes muestra una homología de 71,3 %. La clonación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de *A. niger*, siguiendo el método y los materiales descritos en Mullis *et al.* (1986).

Ejemplo 2: Secuencia de nucleótidos del gen *lacZ* de *S. thermophilus*

La secuencia del gen *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa de *S. thermophilus* está identificada y disponible en las bases de datos y se corresponde con la SEQ ID NO: 2. La proteína se describe como un tetrámero de 124 kDa aproximadamente. El gen *lacZ* se clonó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de *S. thermophilus*, siguiendo el método y los materiales descritos en Mullis *et al.* (1986).

Ejemplo 3: Determinación en placa de la actividad N-acetil-glucosaminidasa del gen *nagA* de *A. niger* sobreexpresado en *S. cerevisiae*

Los transformantes generados con el plásmido p415GPD-nagA-LEU2 en la cepa haploide BY4741 (MATa HIS3D1 LEU2D0 MET15D0 URA3D0) se cultivan en un medio rico en YPD, formulado con 10 g/l de extracto de levadura

(Scharlau Chemie S.A.), 20 g/l de peptona bacteriológica (Pronadisa) y 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono, solidificada con agar al 2 % (Pronadisa).

5 Sobre la placa se vierte una solución licuada del sustrato metilumbeliferil (MU)-N-acetil-glucosamina a una concentración de 1 mM en tampón citrato 45 mM con agarosa al 1% a un pH de 4,8, se incuba a 50 °C durante 30 minutos protegida de la luz y se observa con luz UV. La actividad N-acetil-glucosaminidasa provoca la formación de metilumbeliferona, que es un compuesto fluorogénico, fluorescente al iluminarse con una lámpara de luz UV de 366 nm.

10 Como se muestra en la Figura 2, alrededor de aquellos clones capaces de secretar la enzima nagA (A) se observa un halo fluorescente en relación con cepas control que no expresan nagA (B).

Ejemplo 4: Efecto de la temperatura y del medio de cultivo sobre la actividad de la enzima nag A de *A. niger* recuperada del caldo de cultivo de la cepa recombinante de *S. cerevisiae*.

15 Con el fin de optimizar la expresión del gen *nagA* en *S. cerevisiae*, se realizó un estudio acerca de si la composición del medio y/o la temperatura de cultivo podían influir en la expresión y/o secreción de la enzima.

20 Para ello, se utilizó una cepa recombinante generada mediante transformación de la cepa haploide BY4741 (MATa HIS3D1 LEU2D0 MET15D0 URA3D0) con el plásmido p415GPD-nagA-LEU2. Los transformantes se seleccionaron en medio sintético SD basado en 6,7 g/l de base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos (Difco) y complementado con 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono y 200 mg/l de histidina (Merck), uracilo (Calbiochem) y metionina (Fluka) como requisitos nutricionales.

25 En primer lugar, las células se cultivaron en paralelo en un medio mínimo selectivo y en un medio rico. Como medio mínimo se utilizó medio sintético SD basado en 6,7 g/l de base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos (Difco) y complementado con 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono y 200 mg/l de histidina (Merck), uracilo (Calbiochem) y metionina (Fluka) como requisitos nutricionales; como medio rico se utilizó YPD formulado con 10 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A.), 20 g/l de peptona bacteriológica (Pronadisa) y 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono.

30 El caldo de cultivo resultante del crecimiento de la cepa en ambos medios se ensayó con respecto a la actividad N-acetil-glucosaminidasa en medio líquido utilizando p-nitrofenil (PNP)-N-acetil-glucosamina como sustrato de la reacción. Para ello, se utilizó una alícuota de cada caldo de cultivo y se diluyó en tampón citrato/fosfato 0,09 M a pH 4,8 en presencia del sustrato, incubando a 30 °C durante 30 minutos. La actividad hidrolítica N-acetil-glucosaminidasa se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, como resultado de la misma.

35 Como se observa en la Figura 3, la actividad es casi tres veces mayor en el sobrenadante de cultivo cuando la cepa se cultiva en medio rico que en medio mínimo selectivo, mostrando claramente la influencia del medio de cultivo sobre la expresión y/o secreción de la enzima nagA.

40 En cuanto a la temperatura de crecimiento, el transformante seleccionado se cultivó en paralelo en un medio rico en YPD formulado con 10 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A.), 20 g/l de peptona bacteriológica (Pronadisa) y 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono a 3 temperaturas diferentes: 28, 30 y 32 °C. El caldo de cultivo se analizó en cuanto a su actividad hidrolítica N-acetil-glucosaminidasa en medio líquido. Para ello, se utilizó una alícuota del caldo de cultivo y se diluyó en tampón citrato/fosfato 0,09 M a pH 4,8 en presencia del sustrato p-nitrofenil (PNP)-N-acetil-glucosamina, incubando a 30 °C durante 30 minutos. La actividad hidrolítica N-acetil-glucosaminidasa se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, como resultado de la misma.

45 Como se muestra en la Figura 3, la actividad recuperada en el sobrenadante de cultivo aumenta gradualmente a medida que disminuye la temperatura del cultivo, llegando a ser 50 % mayor cuando la temperatura de cultivo disminuye de 32 a 28 °C. Por tanto, para la expresión y secreción de nagA, se establece una temperatura de cultivo óptima de entre 26 y 30 °C.

50 Como se muestra en la Figura 4, se recupera hasta 3 veces más actividad N-acetil-glucosaminidasa en el caldo de cultivo cuando el transformante nagA crece en medio rico y se recupera más de 4 veces más actividad cuando además la temperatura de cultivo disminuye a 28 °C.

Ejemplo 5: Determinación de la actividad β-galactosidasa del gen *lacZ* de *S. thermophilus* sobreexpresado en las levaduras *S. cerevisiae* y *P. pastoris*

Se generaron cepas recombinantes de *S. cerevisiae* y *P. pastoris*, por transformación de la cepa haploide BY4741 (MATa HIS3D1 LEU2D0 MET15D0 URA3D0) con el plásmido p416GPD-lacZ-URA3 y de la cepa haploide de tipo silvestre X-33 con el plásmido pPICzaB-lacZ, respectivamente. Los transformantes de *S. cerevisiae* se seleccionaron en medio sintético SD basado en 6,7 g/l de base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos (Difco) y complementado con 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono y 200 mg/l de histidina (Merck), leucina (Merck) y metionina (Fluka) como requisitos nutricionales. Los transformantes de *P. pastoris* se seleccionaron en medio YPDS formulado con 10 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A.), 20 g/l de peptona bacteriológica (Pronadisa), 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono, 1 M de sorbitol (Applichem VWR) y 100 µg/ml de Zeocina (Invivogen).

Se cultivaron en los medios indicados y se determinó la actividad hidrolítica beta-galactosidasa en los caldos de cultivo así como en una suspensión celular. Para ello, se diluyó la cantidad indicada de caldo o de suspensión celular en tampón fosfato 100 mM a pH 7 en presencia del sustrato p-nitrofenil (PNP)-galactopiranosido, incubando a 55 °C durante 30 minutos. La actividad hidrolítica beta-galactosidasa se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, como resultado de la misma.

Como se muestra en la Figura 4, en los sobrenadantes de cultivo no se detecta actividad beta-galactosidasa. Tampoco se detecta en el caso del recombinante de *P. pastoris* ni en el de *S. cerevisiae* (A). Los niveles de actividad en las suspensiones celulares son similares en los dos organismos (B).

Ejemplo 6: Localización subcelular de lacZ en recombinantes de lacZ de *S.thermophilus* en *S. cerevisiae*

La cepa recombinante de *S. cerevisiae* se generó mediante transformación de la cepa haploide BY4741 (MATa HIS3D1 LEU2D0 MET15D0 URA3D0) con el plásmido p416GPD-lacZ-URA3 y seleccionando en medio sintético SD basado en 6,7 g/l de base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos (Difco) y complementado con 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono y 200 mg/l de histidina (Merck), leucina (Merck) y metionina (Fluka) como requisitos nutricionales.

El recombinante se cultivó en medio YPD rico formulado con 10 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A.), 20 g/l de peptona bacteriológica (Pronadisa) y 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono a 28 °C. Se separaron tres muestras con el mismo número de células: se preparó una suspensión de células enteras, una de ellas para analizar la actividad en la pared celular; se prepararon protoplastos con otra de las muestras mediante tratamiento de las células con 3 mg/ml de zimoliasa 20T (Seikagaku) durante 15 minutos a 37 °C, para evaluar la actividad lacZ en la membrana plasmática; y finalmente, mecánicamente se produjo la lisis de la tercera muestra y se preparó un extracto celular en el que se evaluó la actividad lacZ citoplasmática. Las tres muestras se prepararon en el mismo volumen.

Utilizando una porción de cada una de las muestras, se llevó a cabo un ensayo de determinación de la actividad hidrolítica beta-galactosidasa en medio líquido, diluyendo cada muestra en tampón fosfato 100 mM a pH 7 en presencia del sustrato p-nitrofenil (PNP)-galactopiranosido e incubando a 55 °C durante 30 minutos. La actividad hidrolítica beta-galactosidasa se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, como resultado de la misma.

Como se observa en la Figura 5, se recupera 3 veces más actividad en el lisado celular que en la pared celular. La actividad en la membrana celular determinada a partir de los protoplastos preparados es muy pequeña. Por tanto, la actividad lacZ en este recombinante se encuentra principalmente en el citoplasma celular y una pequeña porción se encuentra retenida en la pared celular.

Ejemplo 7: Determinación en placa de la actividad beta-galactosidasa del gen lacZ de *S. thermophilus* sobreexpresado en *E. coli*

Se generó un transformante de *E. coli* para el gen lacZ de *S.thermophilus* mediante transformación de la cepa DH5α (*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 √80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) con el plásmido p416GPD-lacZ URA3 y seleccionando en medio LB formulado con 5 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A.), 10 g/l de triptona (Scharlau Chemie S.A.), 10 g/l de cloruro sódico (NaCl) y ampicilina (Calbiochem) a una concentración de 100 mg/l.

Sobre la placa se vertió una solución licuada del sustrato metilumbeliferil (MU)-galactopiranosido a una concentración de 1 mM en tampón fosfato 100 mM con agarosa al 1 % a pH 6, se incubó a 50 °C durante 30 minutos protegida de la luz y se observó con luz UV. La actividad beta-galactosidasa provoca la formación de metilumbeliferona, que es un compuesto fluorogénico que es fluorescente al iluminarse con una lámpara de luz UV de 366 nm.

Como se muestra en la Figura 6, alrededor de aquellos clones capaces de secretar la enzima lacZ (A) se observa un halo fluorescente en relación con cepas control que no expresan lacZ (B).

5 **Ejemplo 8: Obtención de lacto-N-triosa a partir de caldo de cultivo rico en actividad nagA y de sus precursores: lactosa y N-acetil-glucosamina**

10 Para llevar a cabo la reacción de obtención de lacto-N-triosa, se utilizó una cepa recombinante generada mediante transformación de la cepa haploide BY4741 (MATa HIS3D1 LEU2D0 MET15D0 URA3D0) con el plásmido p415GPD-nagA-LEU2. Los transformantes se seleccionaron en medio sintético SD basado en 6,7 g/l de base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos (Difco) y complementado con 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono y 200 mg/l de histidina (Merck), uracilo (Calbiochem) y metionina (Fluka) como requisitos nutricionales.

15 El transformante seleccionado se cultivó a una DO de 40 en lotes en medio 4xYPD formulado con 40 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A.), 80 g/l de peptona bacteriológica (Pronadisa) y 80 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono a 28 °C hasta la saturación.

20 La presencia de la enzima nagA en el sobrenadante de cultivo se comprobó mediante la determinación de la actividad hidrolítica N-acetil-glucosaminidasa en una alícuota del caldo de cultivo diluida en tampón citrato/fosfato 0,09M a pH 4,8 en presencia del sustrato, incubando a 30 °C durante 30 minutos. La actividad hidrolítica N-acetil-glucosaminidasa se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 405 nm debido a la liberación de p-nitrofenol, un compuesto coloreado que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm, como resultado de la misma.

25 Posteriormente, como se esquematiza en la Figura 7, se añadió directamente al medio de cultivo lactosa y N-acetil-glucosamina a alta concentración (330 g/l y 100 g/l respectivamente) y se incubó a 45 °C durante 72 horas. Una fracción del sobrenadante se filtró y mediante HPLC se analizó la presencia de lacto-N-triosa en el mismo.

30 **Ejemplo 9: Influencia de la concentración de sustratos en la producción de lacto-N-triosa en caldo de cultivo**

Con el fin de optimizar el proceso de producción de lacto-N-triosa, se llevaron a cabo ensayos como los descritos anteriormente con cantidades decrecientes de los sustratos lactosa y N-acetil-glucosamina. Se utilizó como referencia la reacción llevada a cabo con 416 g/l de lactosa y 125 g/l de N-acetil-glucosamina y en paralelo se llevaron a cabo reacciones con el 50 %, 33 %, 25%, 10 % y 1 % de los sustratos.

40 Como se observa en la Figura 8, el rendimiento de la reacción disminuye a medida que lo hace la concentración de sustrato en el medio. Sin embargo esta tendencia no es proporcional, perdiéndose únicamente el 7 % del producto para una reducción de hasta el 50 % en la concentración de sustrato y el 33 % con una reducción de hasta el 99 %.

45 **Ejemplo 10: Obtención de lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa en dos etapas secuenciales a partir de caldo de cultivo rico en actividad nagA y extracto celular con actividad lacZ, provenientes de una sola cepa que expresa y secreta nagA y que expresa y no secreta lacZ**

50 La cepa haploide BY4741 (MATa HIS3D1 LEU2D0 MET15D0 URA3D0) se transformó con los plásmidos p415GPD-nagA-LEU2 y p416GPD-lacZ-URA4 simultáneamente. Los transformantes se seleccionaron en medio sintético SD basado en 6,7 g/l de base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos (Difco) y complementado con 20 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono y 200 mg/l de histidina (Merck) y metionina (Fluka) como requisitos nutricionales. La cepa obtenida, recombinante para las dos enzimas, secreta únicamente la proteína nagA. Esto permite separar las dos actividades en un mismo cultivo, la actividad nagA se enriquece en el caldo de cultivo y la actividad lacZ en el interior de la célula.

55 Como se muestra en la Figura 9, la cepa se cultiva a alta densidad en medio 4xYPD formulado con 40 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A.), 80 g/l de peptona bacteriológica (Pronadisa) y 80 g/l de glucosa (Panreac Química S.A.U.) como fuente de carbono a 28C hasta la saturación. Después, se separaron las células del sobrenadante de cultivo. A este último se le añadió lactosa y N-acetil-glucosamina a una concentración de 330 g/l y 100 g/l, respectivamente y se incubó a 45 °C durante 72 horas. Posteriormente, se realizó la lisis de las células y se preparó un extracto celular que se añadió a la reacción, incubándose durante 36 horas más a la misma temperatura. Una fracción del caldo de reacción se filtró y mediante HPLC se analizó la presencia de lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa en el mismo. La cantidad de lacto-N-tetraosa y lacto-N-neotetraosa se determinó en 3,5 gramos por litro de caldo de reacción.

60 **Referencias**

- Arima K, Oshima T, Kubota I, Nakamura N, Mizunaga T, Toh-e A. The nucleotide sequence of the yeast PHO5 gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide. *Nucleic Acids Res.* 25 de marzo de 1983; 11(6):1657-72.
- 5 - Beggs JD. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature.* 14 de septiembre de 1978; 275(5676):104-9.
- Borooh J, Leaback DH, Walker PG. Studies on glucosaminidase. 2. Substrates for N-acetyl-beta-glucosaminidase. *Biochem J.* Enero de 1961; 78(1):106-10.
- Brake AJ. Secretion of heterologous proteins directed by the yeast alpha-factor leader. *Biotechnology.* 1989; 13:269-80.
- 10 - Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* Abril de 1978; 75(4):1929-33.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* Enero de 1983; 153(1):163-8.
- Maruhn D. Rapid colorimetric assay of beta-galactosidase and N-acetyl-beta-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta.* Diciembre de 1976; 73(3):453-61.
- 15 - Matsuo I, Kim S, Yamamoto Y, Ajisaka K, Maruyama JI, Nakajima H, Kitamoto K. Cloning and overexpression of beta-N-acetylglucosaminidase encoding gene nagA from *Aspergillus oryzae* and enzyme-catalyzed synthesis of human milk oligosaccharide. *Biosci Biotechnol Biochem.* Marzo de 2003; 67(3):646-50.
- Meilhoc E, Masson JM, Teissié J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology (N Y).* Marzo de 1990; 8(3):223-7.
- 20 - Mumberg D, Müller R, Funk M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene.* Abril de 1995; 156(1):119-22.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986 51 Pt 1:263-73.
- Perlman D, Halvorson HO, Cannon LE. Presecretory and cytoplasmic invertase polypeptides encoded by distinct mRNAs derived from the same structural gene differ by a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Febrero de 25 1982; 79(3):781-5.
- Reuter S, Rusborg A, Zimmermann W. β -Galactooligosaccharide synthesis with β -galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae*, and *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology.* Septiembre de 1999; 25 (6):509-16.
- 30 - Rose M, Grisafi P, Botstein D. Structure and function of the yeast URA3 gene: expression in *Escherichia coli*. *Gene.* Julio-Agosto 1984; 29(1-2):113-24.
- Smart JB. Transferase reactions of the β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1991 34 (4):495-501.
- 35 - Struhl K, Davis RW. A physical, genetic and transcriptional map of the cloned his3 gene region of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* 25 de enero de 1980; 136(3):309-32.
- Tschumper G, Carbon J. Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. *Gene.* Julio de 1980; 10(2):157-66.
- Whistler RL, Durso DF. Chromatographic separation of sugars on charcoal. *Journal of the American Chemical Society* Febrero de 1950; 72: 677-679.
- 40 - Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H., "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction" *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
- Tschumper G, Carbon J. Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. *Gene.* Julio de 1980; 10(2):157-66.
- 45 - Whistler RL, Durso DF. Chromatographic separation of sugars on charcoal. *Journal of the American Chemical Society* Febrero de 1950; 72:677-679.

<110> HERO ESPAÑA S.A.

<120> OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS MEDIANTE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO

50 <130> AX130354EP

<140> PCT/ES2011/070403

<141> 07-06-2011

<160> 6

55 <170> BISSAP

Secuencia

<210> 1

<211> 1815

60 <212> ADN

<213> *Aspergillus niger*

<400> 1

ES 2 671 555 T3

atgctccttg ctgcctctg gccggcgtgc ctcaagctgc tcgtggccgg gccgcgcgcc 60
 gttaaggtca atcctttacc agctccgcgc aacatttctt ggacttcttc gggtcctaag 120
 cagctggcaa gctttgtcag tctccgtgca tcgcaagata ccctgactt cattctcgcc 180
 aatggatgga atcgcgcctg ggattctatt gtctccttac aatgggtacc cgcagcgacc 240
 gaaggcccca tgtcatccta tcagcctttt cccaccgcga cggccgcggc cggggctact 300
 aaacggctct cgcaggcact gccatcgctg cagtttggtg atgtgaatgt ggctgatctt 360
 gacgoggatc tgcagcatgg agttgacgag tcttacacac tggaggtcac cgagagcgct 420
 acttcagtog tcatcgaggc acccactgtc tggggagcac tccatgcctt tactactctc 480
 cagcagctgg tcatctctga cggacagggc ggcttgataa tcgagcagtc agttaagatc 540
 caggatgcgc cgctctatcc ttaccggggg atcatgcttg aactggctcg aaatcttatc 600
 tcagttagca agatctatga gcagctggac gccatgtcgc tttctaagct caatgttcta 660
 cactggcaca tggaagacac ccaatcgtgg ccagtgcaga ttgatgccta tccagagatg 720
 atccatgatg cctactcccc gcgcgaggta tattcacacg ccgatatgcg caacatcgta 780
 gcgatgccc gagcacgcgg cgtacgggtc attcctgaga ttgatatgcc cagccattcc 840
 gcttctggat ggaaacaggt tgacccccag atggtcaoct gcgtggattc ctggtggtct 900
 aatgatgatt atgccttgca taccgcggta gaacccccac ctggtcaaat ggacatcatt 960
 tacaacggca catatgatgt ggtccgagag gtatataatg agctgtccgg tatcttcccg 1020
 gacaactggt tccatggttg agcggatgag attcagccta actgctttaa cttcagcagc 1080
 tacgtcacc agtggttcgc agaggatccg tcgcgcactt acaatgatct gccccagtac 1140
 tgggtagacc atgctgtacc gatcttcag aactacagtt cctcgcggca gctggttatg 1200
 tgggaagata tcgtgctatc tacggaacat gcgcatgatg taccacaaa tatcgtgatg 1260
 caaacctgga acaacgggct ggattacatc aatcagctga ctgccaaagg ctacgatgtg 1320

 attgtgtcat catcggactt catgtatctg gactgtggga tgggtggctt cctaaccaat 1380
 gatccocgat acgatgtaat gagcaatcca gatocaaaca ctoccaactt caactatggc 1440
 ggcaacggag gctcgtggtg tgcgccgtac aagacgtggc agcgtatcta cgactatgac 1500
 ttcacgcaaa atctgactga cgcacaggcc cagcacatcg tgggcgcgga gccaccctc 1560
 tggtcggaac aagtagatga tgtgactgtc tccagtctgt tctggccgcg cgcctgctgt 1620
 ctggcagagc tggatggtc tgggaatcgg gatgagaatg gacataagcg cagcagctg 1680
 atgacgcagc gtatcttgaa ctttcgcgag tacttgggtg ccaatggggg gcaggogaaa 1740
 gcgctggttc ctaaatactg tgtgcagcgc ccacatacct gcgacttgta tcgcaaccag 1800
 agtgaattc agtaa 1815

Secuencia
<210> 2

ES 2 671 555 T3

<211> 3081

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 2

```

atgaacatga ctgaaaaaat tcaaaacttat ttaaacgatc caaagattgt tagcgttaat      60
actgttgatg ctcaactcaga tcataagtat tttgaatctc ttgaagaatt ttctgaaggg      120
gagatgaagt taagacaatc tcttaatgga aaatggaaaa ttcactatgc tcagaataca      180
aatcaggttt taaaagactt ttataaaaca gaatttgatg aaactgattt gaatttcacg      240
aatgtaccag gtcatttaga gcttcaaggt tttggttctc cacaatatgt gaatacccaa      300
tatccttggg atggtaaaga attccttctg ccacctcaag ttcctcaaga atcaaagtct      360
gttgcatcat acgttaaaca ttttaccttg aatgatgcat taaaagataa aaaagtattt      420
atctcattcc aaggggttgc tacttccatc tttgtatggg tcaatggtaa ctctgtagga      480
tacagtgaag attcatttac acctagttaa tttgaaatta gtgattacct tgttgaaggt      540
gataacaagt tggcggtagc tgtttatcgt tactctacag caagctggtt ggaagaccaa      600
gacttctgga gactttacgg tatttttaga gatgtttact tgtatgctat tccaaaagtt      660
cacgttcaag atctctttgt taaggagat tatgattacc aaacaaaagc aggtcaattg      720
gatattgatt tgaagactgt tggtgattat gaagacaaga agattaaata tgttctttca      780
gattatgaag gcatcgttac agaaggtgat gcatctgtta atggtgacgg tgaactatct      840
gtaagtottg aaaatcttaa aatcaaacct tggagtgtctg aaagtcctaa actttacgat      900
ttgatccttc atgttttggg tgatgaccaa gttgttgaag tcgttccagt taaagttgga      960
tttagacgct ttgaaattaa agataaactt atgcttttga atggtaagag aattgtcttt     1020

```

5

ES 2 671 555 T3

aaaggggta acagacacga atttaacgct agaacaggac gttgtatcac tgaagaagat	1080
atgctttggg atatcaaagt gatgaaacaa cataacatca atgctgttcg tacttoacac	1140
tatcctaacc aaacaogttg gtatgaattg tgtgatgaat atggacttta tgttatogat	1200
gaagccaacc ttgaaacaca cggtagatgg caaaaacttg gtctatgoga accttoatgg	1260
aatatcccag ctagtgaacc agaatggttg cctgcttggt tggatcgtgc caataacatg	1320
ttccaacgcg ataagaacca cgctagtgtt atcatttggg cttgtggtaa tgaatcatat	1380
gctggtaaag atattgctga catggctgat tacttccgta gtggtgacaa tactcgtcca	1440
gttcactatg aaggtggtgc atggtgtcgt gagtttgatt acattacaga catcgaaagt	1500
cgtatgtatg cgaaacccagc tgatatcgaa gaatacctca caactggtaa actagttgat	1560
ctttcaagcg ttagtgataa acactttgct tcaggtaacc taactaacia acctcaaaaa	1620
ccttatattt catgtgaata catgcacaca atgggtaact ctggtgggtg attgcaactc	1680
tacactgact tagagaaata tccagaatac caaggtggat ttatttggga cttcattgac	1740
caagctattt acaaaacact tccaaatggt agcgaattcc tatcatatgg tggtgactgg	1800
catgatagac cttctgacta cgaattttgt ggaaatggta tcgtctttgc agatogtacc	1860
ctaactccaa aacttcaaac agttaaacat ctttactcta atattaagat tgctgttgat	1920
gaaaaatcag taactatcaa gaatgataat ctcttcgaag atctttctgc ttatactttc	1980
ctagctagag tttacgaaga tggtagaaaa gttagtgaaa gtgaatatca ctttgatggt	2040
aaaccaggcg aagaagcaac attcccagtt aactttgtag tccaggcttc aaattctgaa	2100
caaatttacg aagttgcttg tgttctgagg gaagcaactg aatgggctcc taaaggctcat	2160
gaaattgttc gtggtcaata tgttgttgaa aagattagca ctgaaacacc agttaaagca	2220
cctttgaatg ttgttgaagg cgacttcaac atcgggtatc aaggacaaaa cttctcaatc	2280
ttgctttcac gtgcacaaaa tactttagta tctgctaagt ataatggtgt tgaattcatt	2340
gagaaaggtc ctaaacttag cttcactcgt gcttacctg acaacgatcg tggtgctgga	2400
tatccattcg aatggcagg ctggaaggtt gctggaaact atagtaaagt tacagatact	2460
caaattcaaa tcgaagacga ctctgttaaa gtgacttatg tccatgaatt gccaggcttg	2520
tctgatgtcg aagttgaagt aacttatcaa gttgattaca agggctcgaat ctttgttact	2580
gcaaaactat atggtaaagc aggtttgcca aacttcctg aatttggctc agaatttgc	2640
atcggttcac aatttcaaaa ccttagctat tatggatagc gtgcagaaga aagctaccgt	2700
gataaacttc ctggtgccta tcttggtcga tatgaaacat ctggtgaaaa gacatttgc	2760
ccatatctaa tgccacaaga atctggtaat cactatggta ctcgtgaatt cacagtatct	2820
gatgataacc ataatggtct taaattcacc gcacttaata aagcattcga attcagtgc	2880
ttgcgtaaca gtaactgaaca aattgaaaat gctcgtcacc aatatgagtt gcaagaatct	2940

ES 2 671 555 T3

gatgctacat ggattaaagt tcttgctgct caaatgggtg taggtggtga cgacacatgg 3000
 ggtgctccag ttcgatgacga attcttgctt agctcagcag atagctatca attaagcttc 3060
 atgattgaac cactaaatta g 3081

5 Secuencia
 <210> 3
 <211> 91
 <212> Tipo: PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 3

10 **MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG YSDLEGDFDV AVLPPSNSTN 60**
NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLEKREAEAA G 91

15 Secuencia
 <210> 4
 <211> Longitud: 21
 <212> Tipo: PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 4
 MLLQAFLFLL AGFAAKISAL Q 21

20 Secuencia
 <210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 5
 MFKSVVYSIL AASLANALQ 19

30 Secuencia
 <210> 6
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 6

MAYFRLYAVL LAVASSVAAV KVNPLPAPRH ISWGHSGPKP LSDVSLRTER DTDDSIILNA 60
WNRWETIVS LEWVPAGIEA PIPEFDEFPT STPSASAAAT RSKRANVPIQ FVDVDVEDWD 120
ALQHGVDSEY TLDKAGSDA IDITAKTVWG ALHAFTTLQQ LVISDGNGGL ILEQPVHIKD 180
APLYPYRGLM VDTGRNFISV RKLHEQLDGM ALSKLNVLHW HLDDTQSWPV HIDAYPEMTK 240
DAYSARETYS HDDLRNVVAY ARARGIRVIP EIDMPAHSAS GWQQVDPDIV ACANSWWSND 300
NWPLHTAVQP NPGQLDIINP KTYEVVQDVY EELSSIFTDD WFHVGGDEIQ PNCYNFSTYV 360
 35 **TEWFQEDPSR TYNDLMQHWV DKAVPIFRSV SDSRRLVMWE DVVLNTEHAD DVPTDIVMQS 420**
WNGLENINK LTERGYDVIV SSADFMYLDC GRGGYVTNDD RYNEQTNPDP DTPSFNYGGI 480
GGSWCGPYKT WQRIYNYDFT LNLTAQAKH VIGATAPLWS EQVDDVNISN LFWPRAAALA 540
ELVWSGNRDA KGNKRTTLET QRILNFREYL LANGVMAATV VPKYCLQHPH ACDLNYDQTV 600
LH 602

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto N-neotetraosa, que comprende llevar a cabo una reacción utilizando al menos un cultivo de levaduras genéticamente modificadas que proporcionan las actividades de las enzimas responsables de la producción de lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa a partir de lactosa, que comprende:
- a) añadir lactosa y N-acetilglucosamina en presencia de beta-(1,3)-N-acetilglucosaminiltransferasa para formar lacto-N-triosa, y
 - b) añadir galactosa en presencia de beta-galactosiltransferasa para formar lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa,
 - c) permitir la acumulación de lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa, y
 - d) recuperar lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa de dicha mezcla de reacción, caracterizado porque
- las enzimas necesarias para producir la lacto-N-triosa y/o lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa, se producen por levaduras genéticamente modificadas de la especie *S. cerevisiae*, que llevan un vector recombinante que comprende el gen *nagA* de *Aspergillus niger* SEQ ID NO: 1 que expresa una enzima con actividad beta-1-3- N-acetilglucosaminiltransferasa y un vector recombinante que comprende el gen *lacZ* de *Streptococcus thermophilus* SEQ ID NO: 2 que expresa una enzima con actividad beta-galactosiltransferasa.
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado porque una sola levadura de la especie *S. cerevisiae* es la portadora de uno o más vectores que comprenden el gen *nagA* de *Aspergillus niger* SEQ ID NO: 1 que expresa un enzima con actividad beta-1-3 N-acetilglucosaminiltransferasa y el gen *lacZ* de *Streptococcus thermophilus* SEQ ID NO: 2 que expresa un enzima con actividad beta-galactosiltransferasa.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la actividad enzimática de N-acetilglucosaminiltransferasa y/o beta-galactosiltransferasa se recupera del caldo de cultivo, del extracto celular o de enzimas purificadas del medio de cultivo.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha etapa (a) del método tiene una duración aproximada de 70 a 74 horas a una temperatura de 43 °C a 47 °C.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha etapa (a) del método tiene una duración de aproximadamente 72 horas a una temperatura de 45 °C.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque adicionalmente comprende una etapa de extracción y purificación de lacto-N-triosa obtenida en la etapa (a).
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la enzima beta-galactosiltransferasa utilizada en la etapa b) es beta-1-3 galactosiltransferasa para formar lacto-N-tetraosa y/o beta-1-4 galactosiltransferasa para formar lacto-N-neotetraosa.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la lacto-N-tetraosa y/o lacto-N-neotetraosa se obtienen de caldo de cultivo rico en actividad *nagA* y de extracto celular con actividad *lacZ* provenientes de una sola cepa de levadura de la especie *S. cerevisiae* que expresa y secreta *nagA* SEQ ID NO: 1 y que expresa y no secreta *lacZ* SEQ ID NO: 2.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la lacto-N-tetraosa y/o la lacto-N-neotetraosa se obtienen de caldo de cultivo rico en actividad *nagA* y actividad *lacZ* provenientes de una sola cepa de levadura de la especie *S. cerevisiae* que expresa y secreta *nagA* SEQ ID NO: 1 y que expresa y secreta *lacZ* SEQ ID NO: 2.

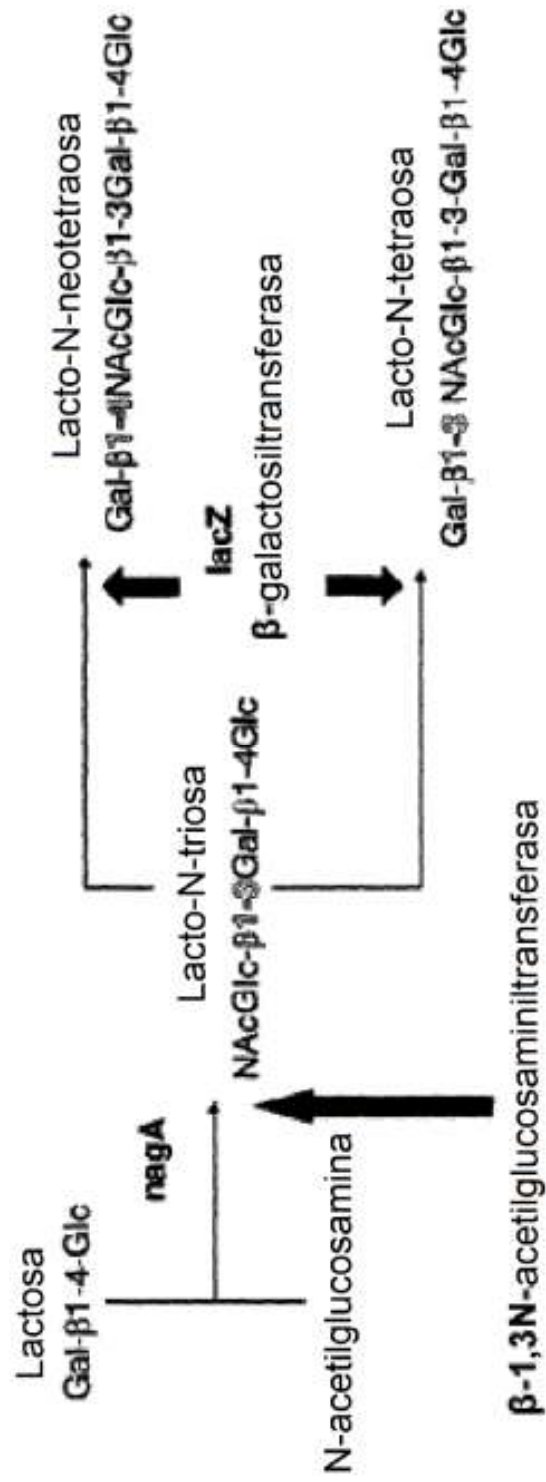


FIG. 1

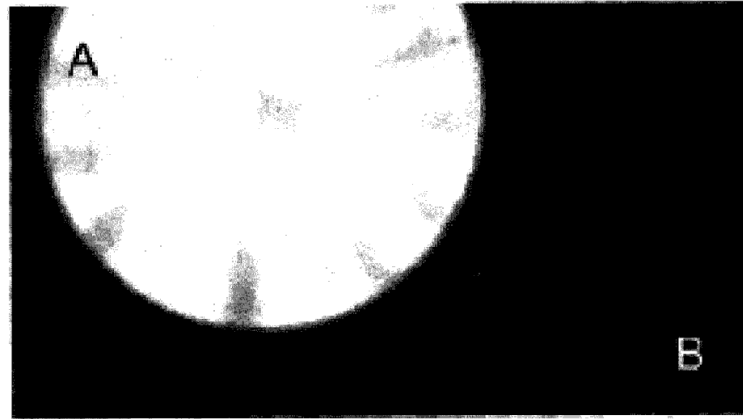


FIG. 2

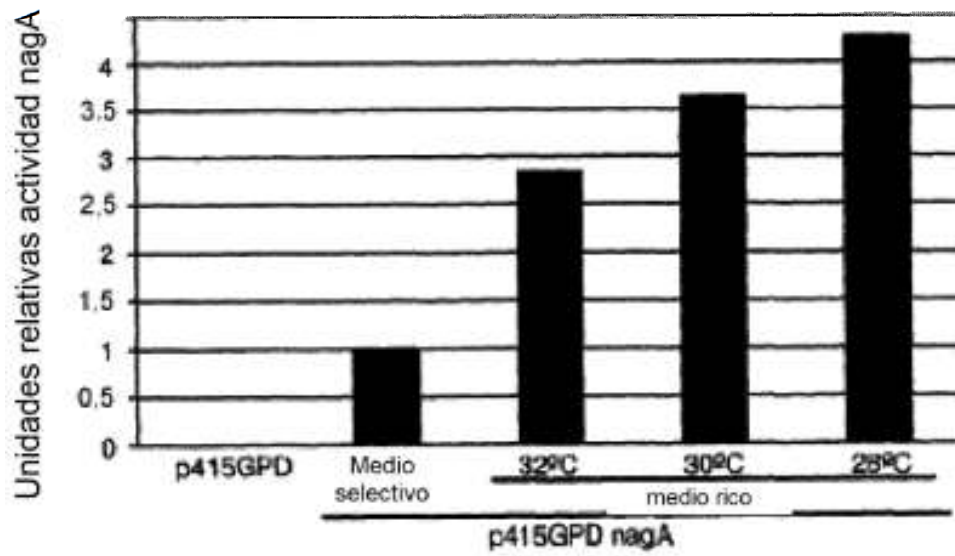


FIG. 3

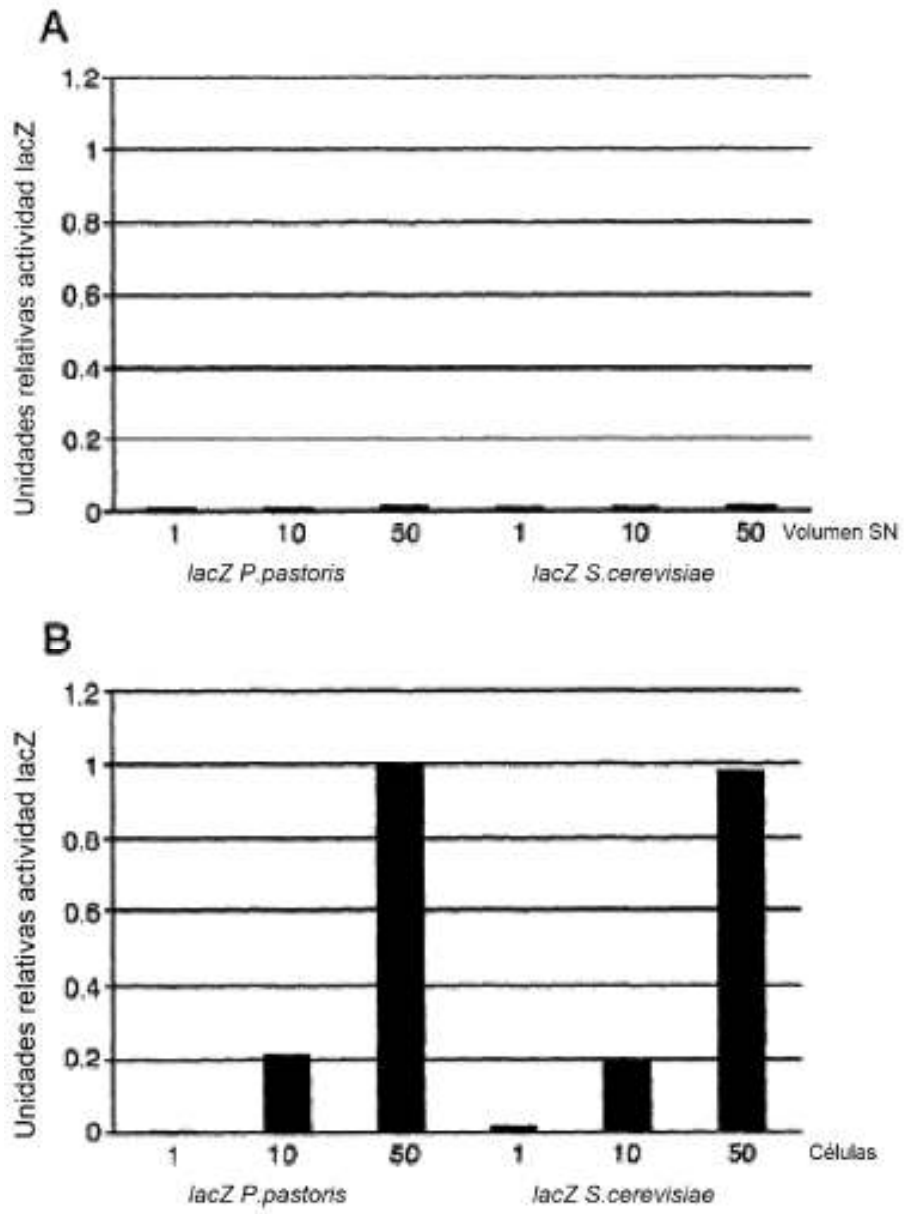


FIG. 4

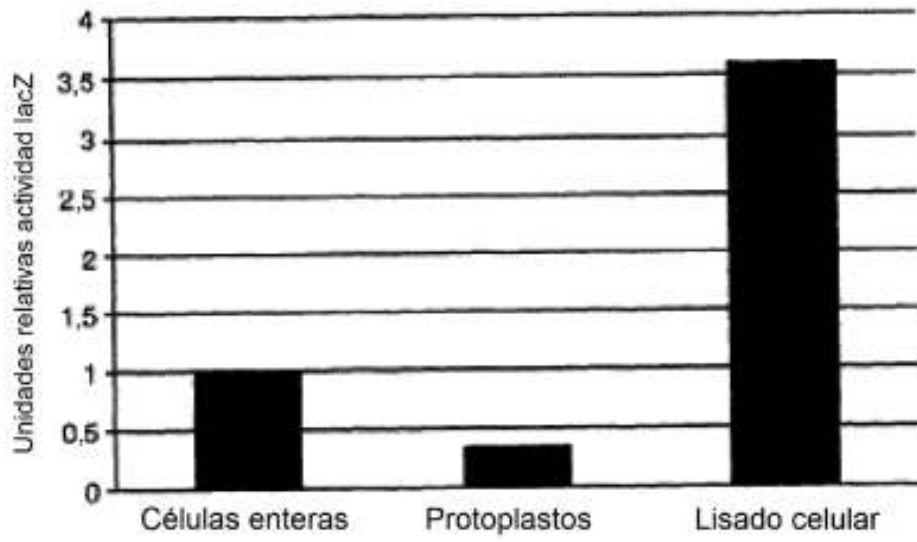


FIG. 5

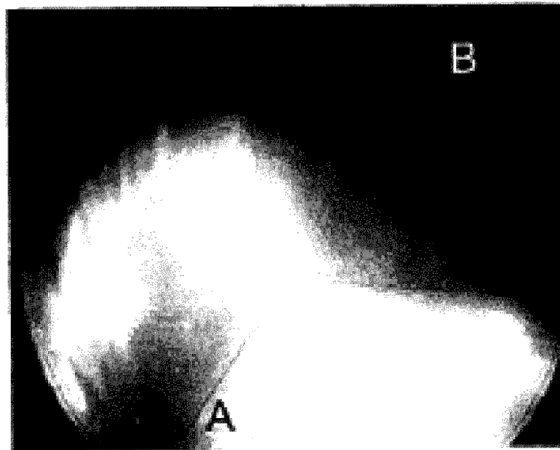


FIG. 6

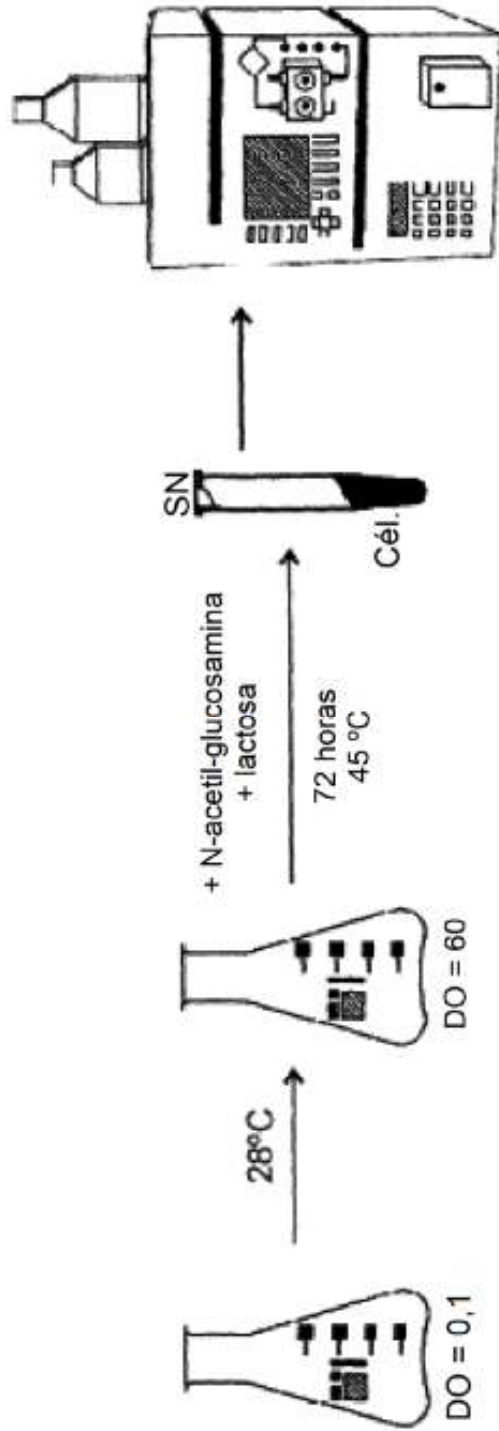


FIG. 7

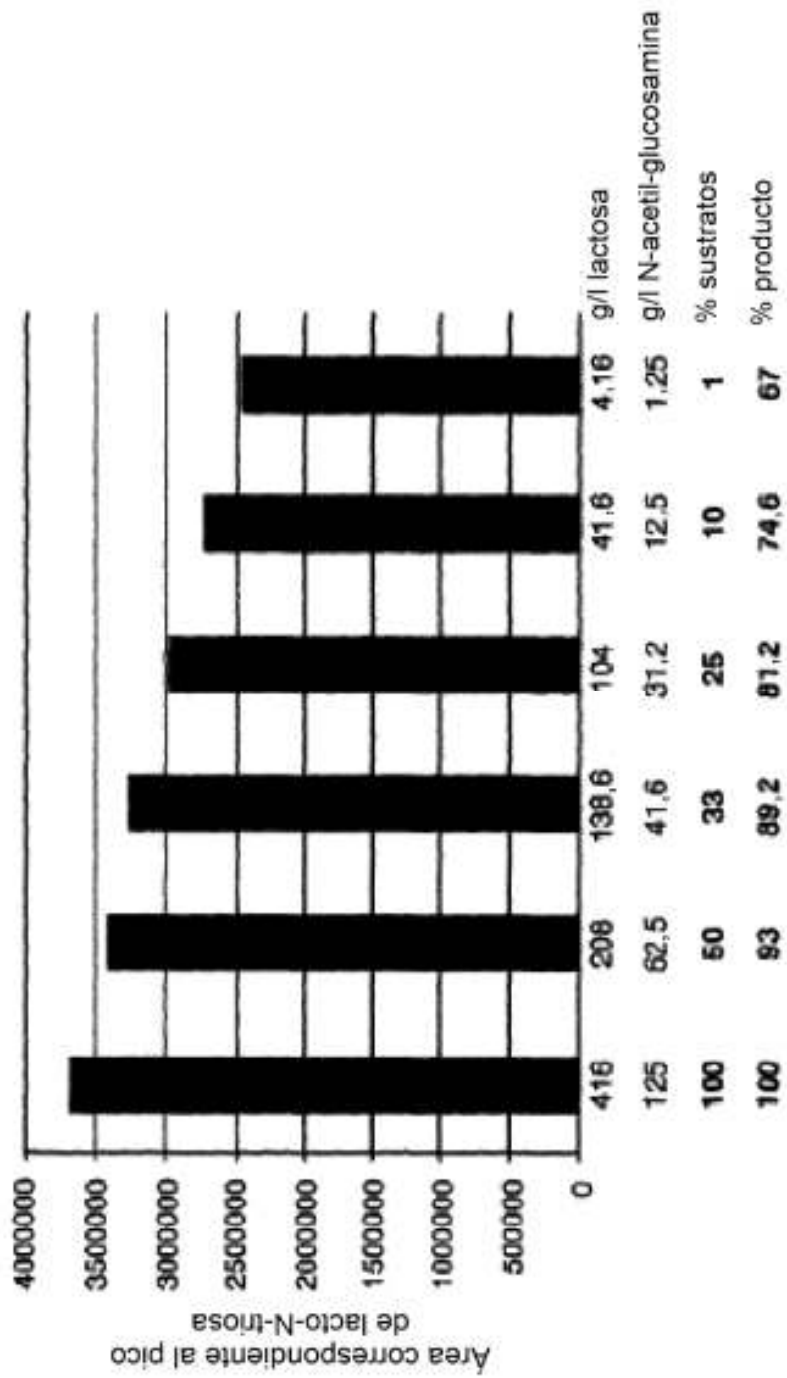


FIG. 8

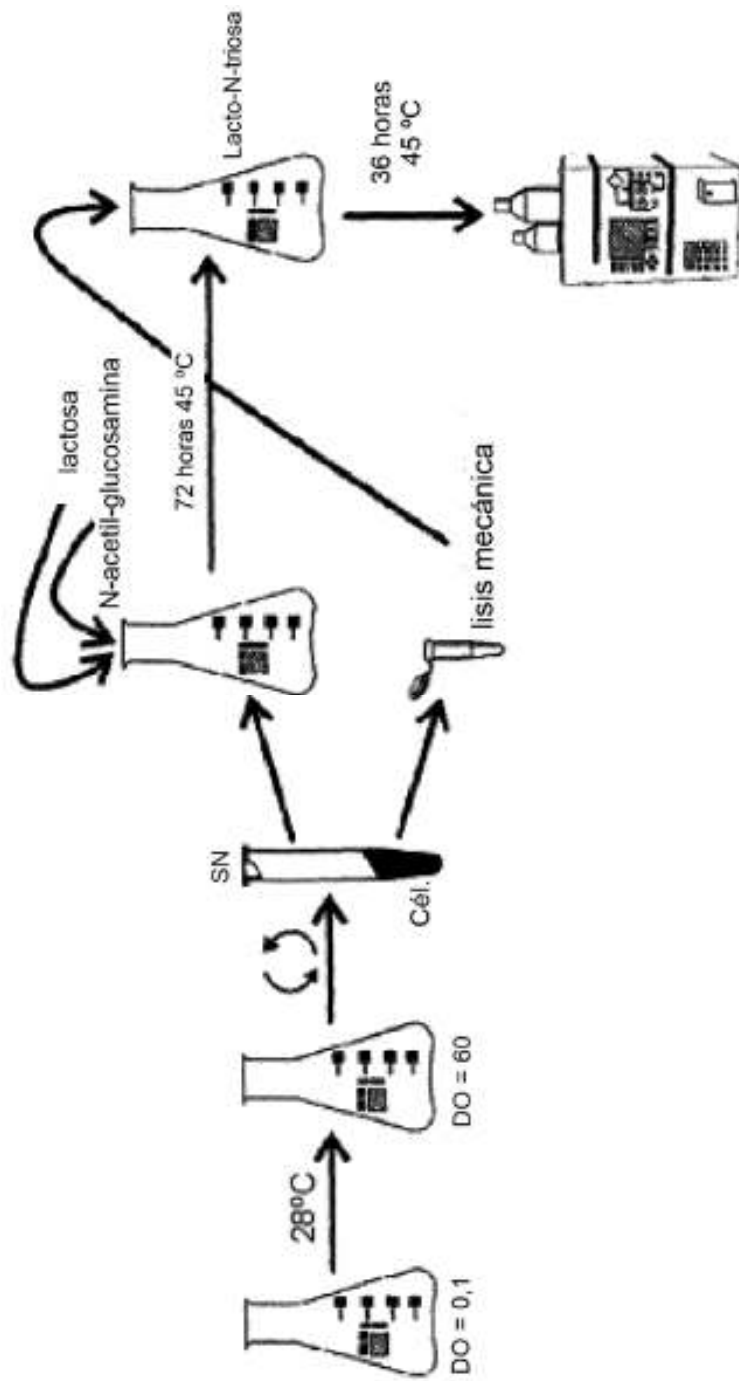


FIG. 9