

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 441**

51 Int. Cl.:

A23L 33/17	(2006.01)
A23L 33/21	(2006.01)
A23L 2/02	(2006.01)
A23L 2/58	(2006.01)
A23L 2/66	(2006.01)
A23L 2/70	(2006.01)
A23L 2/84	(2006.01)
C12P 19/18	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2015 PCT/US2015/014403**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123063**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2015 E 15706574 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3104717**

54 Título: **Reducción de sacarosa y generación de fibra insoluble en zumos**

30 Prioridad:

13.02.2014 US 201461939598 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2021

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es:

GARSKE, ADAM L.

74 Agente/Representante:

FLORES DREOSTI, Lucas

ES 2 813 441 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reducción de sacarosa y generación de fibra insoluble en zumos

Referencia cruzada a solicitud relacionada:

- 5 **[0001]** La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 61/939,598, presentada el 13 de febrero de 2014.

Campo:

[0002] La presente información dada a conocer proporciona un método de mejorar el perfil nutricional de bebidas, especialmente de zumos, a través de manipulación enzimática para alterar sacarosa.

Antecedentes:

- 10 **[0003]** Los estudios sobre el aumento de la dieta humana demuestran que ciertos azúcares (ej. el disacárido sacarosa) son responsables de una gran cantidad de problemas para la salud humana (ver por ejemplo Lustig, R., Sugar: The Bitter Truth, Universidad de California TV, 2009, 89 minutos). Se necesita mejorar la comida y bebidas que contengan menos azúcares problemáticos. además de eliminar los azúcares problemáticos, también se necesitan métodos que produzcan oligosacáridos favorables (ej. fibras insolubles).
- 15 **[0004]** La patente estadounidense 8.168.242 y la solicitud de patente estadounidense 2013/0216652 para las descripciones de algunos aspectos de estos problemas.
- [0005]** La presente información dada a conocer aborda estos problemas actuales mediante el uso de enzimas.

Sumario

- 20 **[0006]** La presente información dada a conocer proporciona un método de elaboración de una bebida con menos calorías y más fibra insoluble comprendiendo; un tratamiento de una bebida que contiene sacarosa con una glucosiltransferasa para convertir sacarosa a alfa (1-3) glucano para elaborar la bebida con menos calorías y más fibra insoluble de acuerdo con la invención 1.

Breve descripción de los dibujos:

[0007]

- 25 Las Figs. 1A-1B muestra algunos datos ilustrativos de acuerdo con la presente información dada a conocer.
La Fig. 2 muestra algunos datos ilustrativos de acuerdo con la presente información dada a conocer.

Secuencia:

[0008]

SEQ ID NO: 1

MDETQDKTQVTSNSGTTASLVTSPPEATKEADKRTNTKEADVLTPAKETNAVETATTTNTQATAE
AATTATTADVAVAAVVPNKEAVVTTDAPAVTTEKAEQFATVKAEEVNTVEVKAPEAALKDSEVEA
ALS LKNIKNIDGKYVYVNEEDGSHKENFAITVNGQLLYFGKDGALTSSTYSFTPGTTNIVDGFS
INNRAYDSSEASFELIDGYLTADSWYRPASIIKDGVTWQASTAEDFRPLLMAWWPVNDTQVNYL
NYMSKVFNLDAKYSSTDKQETLKVAAKDIQIKIEQKIQAEEKSTQWLRETIISAFVKTPQOWNKET
ENYSKGGGEDHLQGGALLYVNDSTRTPWANSDYRRLNRTATNQTGTIDKSILDEQSDPNHMGGF
FLANDVDLSNPVVQAEQLNQIHYLMNWGSI VMGDKDANFDGIRVDAVDNVDADMLQLYTNYFR
EYGVNKSEANALAHISVLEAWSLNDNHYNDKTDGAALAMENKQRLALLFLAKPIKERTPAVS
PLYNNTFNTTQRDEKTDWINKDGSKAYNEDGTVKQSTIGKYNEKYGDASGNYVFI RAHDNNVQD
IIAEI IKKEINPKSDGFTITDAEMKQAFEIYNKMDLSSDKKYTLNNIPAAAYAVMLQNMETITRV
YYGDLYTDDGHYMETKSPYYDTIVNLMKSRIKIVVSGGQAQRSYWLPTDGKMDNSDVELYRTNEV
YTSVRYGKDIMTANDTEGSKYSRTSGQVTLVANNPKLNLDQSAKLVNEMGKIHANQKYRALIVG
TADGIKNFTSDADAI AAGYVKETDSNGVLTFGANDIKGYETFDMSGFVAVVWVPGASDNQDIRV
APSTEAKKEGELTLKATEAYDSQLIYEGFSNFQTI PDGSDPSVYTNRKIAENVDLFKSWGVTSE
EMAPQFVSADDGTFLD SVIQNGYAFADRYDLAMSKNNKYGSKEDLRDALKALHKAGIQA IADWV
PDQIYQLPGKEVVTATR'DGAGRKIADAIIDHSLYVANSKSSGKDYQAKYGGEF'LAELKAKYPE
MFKVNMISTGKPIDDSVKLKQWKAIEYFNGTNVLERGVGYVLSDEATGKYFTVTKEGNFIPLQLT
GKEKVIITGFS SDGKGI TYFGTSGTQAKSAFVTFNNGNTYYFDARGHMVTNSEYSPNGKDVYRFLP
NGIMLSNAFYIDANGNTYLYNSKGQMYKGGYTKFDVSETDKDGKESKVVKFRYFTNEGVMAGV
TVIDGFTQYFGE DGFQAKDKLVTFKGKTYFDAHTGNGIKDTWRNINGKWWYFDANGVAATGAQ
VINGQKLYFNEDGSQVKGGVVKNADGTYSKYKEGFGELVTNEFFTTDGNVWYYAGANGKTVTGA
QVINGQHLYFNADGSQVKGGVVKNADGTYSKYNASTGERLTNEFFTTDGNWYYIIGANGKSVTG
EVKIGDDTYFFAKDGKQVKGQTVSAGNGRISYYYGDSGKRAVSTWIEIQPGVYVYFDKNGLAYP
PRVLN

Descripción detallada de la invención:

[0009] La práctica de la presente información dada a conocer empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica y peletización de pienso para animales, que están dentro de la técnica. Estas técnicas se explican por completo en la literatura, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1994); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Gene Transfer and Expression: Laboratory Manual* (Kriegler, 1990), y *The Alcohol Textbook* (Ingledew *et al.*, eds., quinta edición, 2009), y *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Lindhorste, 2007).

[0010] A menos que se definan de otra forma en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la materia a la que pertenece la presente información dada a conocer. Singleton, *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 20^a ED., John Wiley e Hijos, Nueva York (1994), y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) brindan a un experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente descripción. En la práctica o las pruebas de la presente información dada a conocer, puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento.

[0011] Los intervalos numéricos proporcionados en el presente documento incluyen los números que definen el rango.

Definiciones

[0012] Como se utiliza en el presente documento, «inmovilizado» hace referencia a cualquiera de los diversos enfoques de la utilización de apoyos para reducir el movimiento de la enzima glucosiltransferasa, incluyendo unión covalente, atrapamiento, adsorción física, y reticulación. Los enfoques ilustrativos de inmovilización se encuentran en EP 1379674B1, EP0641859 y en las referencias citadas.

[0013] Como se utiliza en el presente documento, la «bebida que contiene sacarosa» hace referencia a cualquier bebida que contenga una cantidad suficiente de sacarosa para beneficiarse de los enfoques de reducción de sacarosa de la presente información dada a conocer, e incluye zumos (p. ej. de manzana y de naranja).

5 **[0014]** Como se utiliza en el presente documento, «alfa (1-3) glucano» hace referencia a un oligosacárido que contiene enlaces alfa 1-3 entre los monómeros de glucosa.

[0015] Como se utiliza en el presente documento, «glucosiltransferasa de *Streptococcus salivarius*» se refiere a una enzima como se enseña generalmente por ilustración en Giffard et al., *J. Gen Microbiol.* 1993-65, 1397). 1511-22, y Simpson et al., *Microbiology* (1995), 141, 1451-1460. En el presente documento, también se denomina como «GtfJ». Se proporciona una enzima ejemplificada como SEQ ID NO: 1.

10 **[0016]** Los términos «natural», «parental» o «de referencia», con respecto a un polipéptido, se refieren a un polipéptido de origen natural que no incluye una sustitución, inserción o deleción sintética en una o más posiciones de aminoácidos. De forma similar, los términos «natural», «parental» o «de referencia», con respecto a un polinucleótido, se refieren a un polinucleótido de origen natural que no incluye un cambio de nucleósidos sintético. No obstante, nótese que un polinucleótido que codifica un polipéptido natural, parental o de referencia no está limitado a un polinucleótido de origen natural, y abarca cualquier polinucleótido que codifique el polipéptido natural, parental o de referencia.

[0017] Se entiende que la referencia al polipéptido natural incluye la forma madura del polipéptido. Un polipéptido «maduro» o variante del mismo, es uno en el que no existe una secuencia señal, por ejemplo, que se desprende de una forma inmadura del polipéptido durante o después de la expresión del polipéptido.

20 **[0018]** El término «variante», con respecto a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido específico natural, parental o de referencia en cuanto a que este incluye una o varias sustituciones, inserciones o deleciones de origen natural o artificial de un aminoácido. Del mismo modo, el término «variante», con respecto a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que difiere en cuanto a la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido específico natural, parental o de referencia. La identidad del polipéptido o polinucleótido natural, parental o de referencia resultará evidente a partir del contexto.

25 **[0019]** El término «recombinante», cuando se utiliza en referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector del sujeto, indica que el sujeto ha sido modificado a partir desde estado nativo. En consecuencia, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos a distintos niveles o en condiciones distintas de las que se hallan en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes difieren de la secuencia nativa por uno o más nucleótidos y/o están operativamente ligados a secuencias heterólogas, p. ej., un promotor heterólogo en un vector de expresión. Las proteínas recombinantes pueden diferir de una secuencia nativa por uno o más aminoácidos y/o se fusionan con secuencias heterólogas. Un vector comprendiendo un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa es un vector recombinante.

30 **[0020]** Los términos «recuperado/a(s)», «aislado/a(s)» y «separado/a(s)» se refieren a un compuesto, proteína (polipéptidos), célula, ácido nucleico, aminoácido u otro material o componente especificado que se elimina de, al menos, un otro material o componente al que se asocia de forma natural como se halla en la naturaleza. Un polipéptido «aislado», del mismo, incluye, pero no está limitado a, un caldo de cultivo que contiene un polipéptido segregado expresado en una célula hospedadora heteróloga.

35 **[0021]** El término «purificado/a(s)» se refiere a un material (p. ej., un polipéptido o polinucleótido aislado) que se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 90 % puro, al menos aproximadamente 95 % puro, al menos aproximadamente 98 % puro, o incluso al menos aproximadamente 99 % puro.

40 **[0022]** El término «enriquecido/a(s)» se refiere a un material (p. ej. un polipéptido o polinucleótido aislado) que es aproximadamente 50 % puro, al menos aproximadamente 60 % puro, al menos aproximadamente 70 % puro, o incluso al menos aproximadamente 70 % puro.

[0023] Un «rango de pH» con referencia a una enzima, se refiere al rango de valores de pH bajo los cuales la enzima exhibe la actividad catalítica.

45 **[0024]** Los términos «pH estable» y «estabilidad de pH», con referencia a una enzima, relacionan la habilidad de la enzima para retener actividad sobre un amplio rango de valores de pH durante un período predeterminado de tiempo (p. ej. 15 min, 30 min, 1 hora).

[0025] El término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo de los términos «polipéptido», «proteína» y «péptido», y se utilizan indistintamente. En los casos en los que dichas secuencias de aminoácidos muestran actividad, se puede hacer referencia a estas como una «enzima». Se emplean los códigos convencionales de una letra o de tres letras para los residuos de aminoácidos, estando presentes las secuencias de aminoácidos en la orientación habitual amino-carboxi terminal (es decir, N→C).

[00206] El término «ácido nucleico» abarca ADN, ARN, heterodúplex, y moléculas sintéticas capaces de codificar un polipéptido. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y pueden ser modificaciones químicas. Los términos «ácido nucleico» y «polinucleótido» se utilizan indistintamente. Dado que el código genético está degenerado, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido concreto, y las presentes composiciones y métodos abarcan secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos concreta. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácido nucleico se presentan en una orientación 5-a-3.

[0027] «Hibridación» se refiere al proceso por el cual una cadena de ácido nucleico forma un dúplex con, *p. ej.*, pares de bases con una cadena complementaria, como se produce durante las técnicas de hibridación en mancha y las técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Las condiciones de hibridación de astringencia se ejemplifican median hibridación en las siguientes condiciones: 65 °C y 0,1X SSC (donde 1X SSC= 0,15 M NaCl, 0,015 citrato M Na₃, pH 7,0) Los ácidos nucleicos dúplex hibridizados se caracterizan por una temperatura de fusión (T_m), donde una mitad de los ácidos nucleicos hibridizados no están emparejados con la cadena complementaria. Los nucleótidos mal emparejados dentro del dúplex bajan la T_m. Las condiciones de hibridación muy astringentes suponen 68 °C y 0,1X SSC.

[0028] Una molécula «sintética» se produce por síntesis química o enzimática in vitro en lugar de por un organismo.

[0029] Los términos «transformado/a(s)», «transformado/a(s) de forma estable» y «transgénico/a(s)», utilizados en referencia a una célula significan que la célula contiene una secuencia de ácido nucleico no nativo (*p. ej.* heteróloga) integrada en su genoma o llevada a cabo como un episoma que se mantiene a través de múltiples generaciones.

[0030] El término «introducido/a(s)» en el contexto de inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula significa «transfección», «transformación» o «transducción», como se conoce en la técnica.

[0031] Una «cepa hospedadora» o «célula hospedadora» es un organismo en el que se ha introducido un vector de expresión, fago, virus, u otro constructo de ADN, incluyendo un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés (*p. ej.*, una glucosiltransferasa). Las cepas hospedadoras ejemplares son células de microorganismos (*p. ej.* bacterias, hongos filamentosos y levaduras) capaces de expresar el polipéptido de interés. El término «célula hospedadora» incluye protoplastos creados a partir de células.

[0032] El término «heterólogo/a(s)», en referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que no está presente de forma natural en una célula hospedadora.

[0033] El término «endógeno/a(s)», en referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que está presente de forma natural en la célula hospedadora.

[0034] El término «expresión» se refiere al proceso por el cual un polipéptido se produce en función de una secuencia de ácido nucleico. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

[0035] Un «marcador selectivo» o «marcador de selección» se refiere a un gen capaz de ser expresado en una hospedadora para facilitar la selección de células hospedadoras portadoras del gen. Entre los ejemplos de marcadores de selección se incluyen, sin carácter limitativo, sustancias antimicrobianas (*p. ej.*, higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, como una ventaja nutricional, en la célula hospedadora.

[0036] Un «vector» se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de fago, casetes y similares.

[0037] Un «vector de expresión» se refiere a un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, cuya secuencia de codificación está ligada de forma operativa a una secuencia control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en una hospedadora adecuada. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar

la transcripción, una secuencia que codifique sitios de unión del ribosoma adecuados en el ARNm, potenciadores y secuencias que controlen la terminación de la transcripción y la traducción.

5 **[0038]** El término «ligado/a(s) de forma operativa» significa que los componentes específicos se encuentran relacionados (incluyendo, sin carácter limitativo, mediante yuxtaposición), permitiéndoles funcionar de una forma prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora está ligada de forma operativa a una secuencia de codificación si la expresión de la secuencia de codificación está controlada por las secuencias reguladoras.

[0039] Una «secuencia señal» es una secuencia de aminoácidos unidos a la parte del terminal N de una proteína, que facilita la secreción de la proteína fuera de la célula. La forma madura de una proteína extracelular carece de la secuencia señal, que se escinde durante el proceso de secreción.

10 **[0040]** «Biológicamente activo» se refiere a una secuencia que presenta una actividad biológica especificada, como una actividad enzimática.

[0041] El término «actividad específica» se refiere al número de moles de sustrato que pueden convertirse en producto mediante una enzima o preparado enzimático por unidad de tiempo en condiciones específicas. La actividad específica se expresa generalmente como (U)/mg de proteína.

15 **[0042]** Como se utiliza en el presente documento, «identidad de secuencia porcentual» significa que una secuencia particular tiene, al menos, un cierto porcentaje de residuos de aminoácidos idénticos a aquellos de una secuencia de referencia especificada, cuando están alineados utilizan el algoritmo CLUSTAL W con parámetros por defecto. Ver Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). Los parámetros por defecto del algoritmo CLUSTAL W incluyen:

Penalización por hueco de apertura	10,0
Penalización por hueco de extensión	0,05
Matriz de peso de la proteína:	Serie BLOSUM
Matriz de peso del ADN:	IUB
Secuencias divergentes retardadas %:	40
Distancia de separación de agujero:	8
Peso de transiciones de ADN:	0,50
Lista de residuos hidrófilos:	GPSNDQEKR
Uso de matriz negativa:	OFF
Alteración de penalizaciones específicas de residuos	ON
Alternación de penalizaciones hidrófilas	ON
Alternación de la penalización de separación de agujero final	OFF

20

[0043] Las deleciones se cuentan como residuos no idénticos, comparados con una secuencia de referencia. Se incluyen las deleciones que se produzcan en cualquiera de los dos terminales. Por ejemplo, una variante con cinco aminoácidos del terminal C del polipéptido maduro de residuos 617 tendría una identidad porcentual de secuencia del 99 % (612/617 residuos idénticos x 100, redondeados al número entero más cercano) relativo al polipéptido maduro. Dicha variante estaría abarcada por una variante que presenta «al menos un 99 % de identidad de secuencia» con un polipéptido maduro.

25

[0044] Las secuencias de polipéptidos «fusionados» están conectadas, *p. ej.*, están ligadas de manera operativa, mediante un enlace de péptidos entre dos secuencias de polipéptidos del sujeto.

30

[0045] El término «hongo filamentoso» se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina, particularmente a las especies Pezizomycotina.

[0046] El término «aproximadamente» se refiere a ± 5 % del valor referenciado.

Mutaciones adicionales

5 **[0047]** En algunas formas de realización, la glucosiltransferasa incluye además una o más mutaciones que proporcionan un mayor rendimiento o beneficio de estabilidad. Las ventajas de rendimiento ejemplares incluyen, pero sin carácter limitativo, estabilidad térmica aumentada, estabilidad de almacenamiento aumentada, solubilidad aumentada, un perfil de pH alterado, dependencia de calcio disminuida, actividad específica aumentada, especificidad de sustrato modificada, unión de sustrato modificada, actividad dependiente de pH modificada, estabilidad dependiente de pH modificada, estabilidad oxidante aumentada, y expresión aumentada. En algunos casos, la ventaja de rendimiento se lleva a cabo a una temperatura relativamente baja. En algunos casos, la ventaja de rendimiento se lleva a cabo a una temperatura relativamente alta.

10 **[0048]** Además, las glucosiltransferasas presentes pueden incluir cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos. En la siguiente tabla se enumeran sustituciones conservadoras de aminoácidos ejemplares.

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

[0049]

<i>Para aminoácidos</i>	<i>Código</i>	<i>Reemplazar con cualquiera de</i>
Alanina	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, b-Ala, Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3,4, o 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, L-l-tioazolidina-4-ácido carboxílico, D-o L-1-oxazolidina-4-ácido carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

15

[0050] El lector apreciará que algunas de las mutaciones conservativas mencionadas anteriormente pueden producirse mediante manipulación genética, mientras otras se producen mediante la introducción de aminoácidos sintéticos en un polipéptido mediante genética u otros medios.

20 **[0051]** Las glucosiltransferasas presentes pueden ser «precursoras», «inmaduras» o «de longitud completa» en cuyo caso incluyen una secuencia señal, o «maduras», en cuyo caso carecen de una secuencia señal. Las formas maduras de los polipéptidos son, generalmente, las más útiles. A menos que se indique lo contrario, la numeración de residuos de aminoácidos empleada en el presente documento se refiere a las formas maduras de los

respectivos polipéptidos de glucosiltransferasa. Los polipéptidos de glucosiltransferasa presentes también pueden truncarse para eliminar los terminales N o C, siempre que los polipéptidos resultantes retengan la actividad de la glucosiltransferasa.

- 5 [0052] La glucosiltransferasa presente puede ser un polipéptido «quimérico» o «híbrido», en el que se incluye al menos una parte de un primer polipéptido de glucosiltransferasa, y al menos una parte de un segundo polipéptido de glucosiltransferasa. La glucosiltransferasa presente puede incluir además una secuencia señal heteróloga, un epítipo para permitir el seguimiento o la purificación, o similares. Las secuencias señal heterólogas ejemplares son de *B. licheniformis* amilasa (LAT), *B. subtilis* (AmyE o AprE) y *Streptomyces* CelA.

Producción de variantes de glucosiltransferasas

- 10 [0053] La glucosiltransferasa presente puede producirse en células hospedadoras, por ejemplo, mediante secreción o expresión intercelular. Un material celular cultivado (*p. ej.*, un caldo de células enteras) que comprende una glucosiltransferasa que se puede obtener siguiendo la secreción de la glucosiltransferasa en el medio celular. Opcionalmente, la glucosiltransferasa puede aislarse de las células hospedadoras, o incluso aislarse del caldo de células, dependiendo de la pureza deseada de la glucosiltransferasa final. Un gen que codifica una
15 glucosiltransferasa puede clonarse y expresarse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Las células hospedadoras apropiadas incluyen células bacterianas, fúngicas (incluyendo hongos y hongos filamentosos), y vegetales (incluyendo algas). Las células hospedadoras especialmente útiles incluyen *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* o *Trichoderma reesei*. Otras células hospedadoras incluyen células bacterianas, *p. ej.* *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*, además de *Streptomyces*, *E. Coli*.
- 20 [0054] Las células hospedadoras pueden expresar además un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa homóloga o heteróloga, *p. ej.*, una glucosiltransferasa que no es de la misma especie que la célula hospedadora, o una o más enzimas. La glucosiltransferasa puede ser una variante de glucosiltransferasa. Adicionalmente, la hospedadora puede expresar una o más enzimas accesorias, proteínas, péptidos.

Vectores

- 25 [0055] Un constructo de ADN comprendiendo un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa que se puede construir o expresar en una célula hospedadora. Debido a la conocida degeneración del código genético, se pueden diseñar y elaborar con habilidad rutinaria las variantes de polinucleótidos que codifican una secuencia idéntica de aminoácidos. También es bastante conocida en la técnica la optimización del uso de codón para una célula hospedadora particular. Los ácidos nucleicos que codifican glucosiltransferasa pueden incorporarse en un
30 vector. Los vectores pueden transferirse a una célula hospedadora utilizando técnicas de transformación conocidas, como las que se describen a continuación.

- [0056] El vector puede ser cualquier vector que se pueda transformar en y reproducirse dentro de una célula hospedadora. Por ejemplo, un vector que comprende un ácido nucleico codificando una glucosiltransferasa puede transformarse y reproducirse en una célula hospedadora bacteriana como medio de propagación y amplificación del vector. El vector también se puede transformar en una hospedadora de expresión, para que los ácidos nucleicos de codificación se puedan expresar como una glucosiltransferasa funcional. Las células hospedadoras que sirven como hospedadoras de expresión pueden incluir hongos filamentosos, por ejemplo. El catálogo de cepas de The Fungal Genetics Stock Center (FGSC) enumera vectores apropiados para expresión en células hospedadoras de hongos. Ver FGSC, Catálogo de Cepas, Universidad de Misuri, en www.fgsc.net (última modificación el 17 de
35 enero de 2007). Un vector representativo es pJG153, un vector que puede reproducirse en una hospedadora bacteriana. Ver Harrison et al. (Junio 2011) *Microbiol.* 77: 3916-22. pJG153 puede modificarse con habilidad rutinaria para comprender y expresar un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa.
- 40

- [0057] Un ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa puede estar ligado de manera operativa a un promotor apropiado que permite transcripción en la célula hospedadora. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas tanto homólogas como heterólogas a la célula hospedadora. Promotores ejemplares para direccionar la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una glucosiltransferasa, especialmente en una hospedadora bacteriana, son los promotores del operon lac de *E. coli*, los promotores del gen de agarasa dagA o celA *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de la α -amilasa *Bacillus licheniformis* (amyL), los promotores del gen de la amilasa maltogénica *Bacillus stearothermophilus* (amyM), los promotores de la α -amilasa *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), los promotores de los genes *Bacillus subtilis* xylA y xylB, etc. Para la transcripción en una hospedadora fúngica, los ejemplos de promotores útiles son los que derivan del gen que codifica amilasa *Aspergillus oryzae* TAKA, proteinasa aspártica *Rhizomucor miehei*, α -amilasa neutral *Aspergillus niger*, α -amilasa de ácido estable *A. niger*, glucoamilasa *A. niger*, lipasa *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina *A. oryzae*, triosa
45
50

fosfato isomerasa *A. oryzae*, o acetamidasa *A. nidulans*. Cuando un gen que codifica una glucosiltransferasa se expresa en especies bacterianas como *E. coli*, se puede seleccionar un promotor apropiado, por ejemplo, de un promotor fago incluyendo un promotor T7 y un promotor fago lambda. Ejemplos de promotores apropiados para la expresión en una especie de hongo, pero sin carácter limitativo, los promotores Gal 1 y Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae* y los promotores AOX1 y AOX2 de *Pichia pastoris*. *cbhl* es un promotor inducible y endógeno de *T. reesei*. Ver Liu et al. (2008) «Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization», *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* 40(2): 158-65.

[0058] La secuencia de codificación puede estar ligado de manera operativa a una secuencia señal. El ADN codificando la secuencia señal puede ser la secuencia de ADN asociada naturalmente al gen de glucosiltransferasa que se va a expresar o de un diferente gen o especie. Una secuencia señal y una secuencia promotora comprendiendo un constructo de ADN o vector se pueden introducir en una célula hospedadora fúngica y pueden derivarse de la misma fuente. Por ejemplo, la secuencia señal es la secuencia señal *cbhl* que está ligada de forma operativa al promotor *cbhl*.

[0059] Un vector de expresión también puede comprender un terminador de transcripción apropiado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación ligadas de forma operativa a la secuencia de ADN que codifica una variante de glucosiltransferasa. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden derivar apropiadamente de las mismas fuentes que el promotor.

[0060] El vector puede además comprender una secuencia de ADN activando el vector para duplicarlo en la célula hospedadora. Los ejemplos de tales secuencias son los orígenes de la duplicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, and pIJ702.

[0061] El vector también puede comprender un marcador seleccionable, p. ej. un gen el producto del cual complementa un defecto en la célula hospedadora aislada, como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o un gen que confiera resistencia antibiótica como, p. ej., resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección *Aspergillus* como *amdS*, *argB*, *niaD* and *xxsC*, un marcador que da lugar a la resistencia a la higromicina, o la selección puede conseguirse mediante cotransformación, como la conocida en la técnica. Ver p. ej., Aplicación PCT WO 91/17243 internacional.

[0062] La expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, p. ej., cuando se utilizan distintas bacterias u hongos como células hospedadoras para producir una gran cantidad de glucosiltransferasa para purificación o enriquecimiento. La secreción extracelular de glucosiltransferasa hacia el medio de cultivo también se puede utilizar para producir un material celular cultivado comprendiendo la glucosiltransferasa aislada.

[0063] El vector de expresión normalmente incluye los componentes de un vector de clonación, como, por ejemplo, un elemento que permite la reproducción autónoma del vector en el organismo hospedador seleccionado y uno o más marcadores detectables fenotípicamente para fines de selección. La expresión del vector comprende, normalmente, secuencias de nucleótidos de control como un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de translación y, opcionalmente, un gen represor o uno o más genes activadores. Adicionalmente, la expresión del vector puede comprender una secuencia codificando una secuencia de aminoácido capaz de dirigir la glucosiltransferasa a un orgánulo de célula hospedadora como un peroxisoma, o a un compartimento particular de la célula hospedadora. Tal secuencia de dirección incluye, pero sin carácter limitativo, la secuencia SKL. Para expresión bajo la dirección de secuencias de control, la secuencia de ácido nucleico de la glucosiltransferasa está ligada de forma operativa a las secuencias de control de manera adecuada con respecto a la expresión.

[0064] Los procedimientos utilizados para ligar el constructo de ADN que codifica una glucosiltransferasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en los vectores apropiados que contienen la información necesaria para la reproducción, son muy conocidos por personas expertas en la materia (ver, p. ej., Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989, y 3rd ed., 2001)

Transformación y cultivo de las células hospedadoras

[0065] Una célula aislada, comprendiendo ambos constructos de ADN o un vector de expresión, se utiliza ventajosamente como una célula hospedadora en la producción recombinante de una glucosiltransferasa. La célula puede transformarse con el constructo de ADN codificando la enzima, convenientemente integrando el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma hospedador. Esta integración se considera, generalmente, una ventaja, ya que la secuencia de ADN es más probable que se mantenga estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma hospedador puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos convencionales, p. ej., mediante recombinación homóloga o heteróloga. De manera alternativa, la célula puede

transformarse con un vector de expresión como se describe anteriormente en conexión con los diferentes tipos de células hospedadoras.

[0066] Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos son especies de bacterias grampositivas como *Bacillaceae* incluyendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Geobacillus* (anteriormente *Bacillus*) *stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, y *Bacillus thuringiensis*; las especies *Streptomyces* como *Streptomyces murinus*; especies de ácido láctico bacteriano incluyendo *Lactococcus* sp. como *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus* sp. incluyendo *Lactobacillus reuteri*; *Leuconostoc* sp.; *Pediococcus* sp.; y *Streptococcus* sp. De forma alternativa, se pueden seleccionar como el organismo hospedador cepas de una especie bacteriana pertenecientes a *Enterobacteriaceae*, incluyendo *E. coli*, o a *Pseudomonadaceae*.

[0067] Se puede seleccionar un organismo hospedador de hongos apropiado de las especies de hongos de interés biológico como, sin carácter limitativo, especies de hongos tales como *Pichia* sp., *Hansenula* sp., o especies *Kluyveromyces*, *Yarrowinia*, *Schizosaccharomyces* o una especie de *Saccharomyces*, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* o una especie perteneciente a *Schizosaccharomyces* como, por ejemplo, especie *S. pombe*. Se puede utilizar como organismo hospedador una cepa de la especie de hongos metilotrófica, *Pichia pastoris*. De forma alternativa, el organismo hospedador puede ser una especie *Hansenula*. Organismos hospedadores apropiados entre hongos filamentosos incluyen especies de *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tubigenensis*, *Aspergillus awamori*, o *Aspergillus nidulans*. De forma alternativa, se pueden utilizar como los organismos hospedadores cepas de una especie *Fusarium*, p. ej., *Fusarium oxysporum* o de una especie *Rhizomucor* como *Rhizomucor miehei*. Otras cepas apropiadas incluyen especies *Thermomyces* y *Mucor*. Además, se puede utilizar como un huésped la especie *Trichoderma* sp. Un procedimiento apropiado para transformación de células hospedadoras *Aspergillus* incluye, por ejemplo, las descritas en EP 238023. Una glucosiltransferasa expresada por una célula hospedadora fúngica puede ser glicosilada, p. ej., comprenderá una fracción de glicosil. El patrón de glicosilación puede ser el mismo o diferente que la presente en la glucosiltransferasa natural. El tipo y/o grado de glicosilación puede impartir cambios en las propiedades enzimáticas y/o bioquímicas.

[0068] Es ventajoso eliminar genes de las hospedadoras de expresión, donde se puede curar la deficiencia del gen mediante el vector de expresión transformado. Se pueden utilizar métodos conocidos para obtener una célula hospedadora fúngica que presenta uno o más genes inactivos. La desactivación genética puede conseguirse mediante una delección completa o parcial, mediante desactivación por inserción o mediante otro medio que proporcione un gen no funcional para el fin destinado, de manera que se impida la expresión del gen de una proteína funcional. Se puede eliminar cualquier gen *Trichoderma* sp. u otro hospedador fúngico filamentosos que haya sido clonado, por ejemplo, los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. La delección de genes se puede lograr insertando una forma del gen deseado para desactivarlo en un plásmido mediante métodos conocidos en la técnica.

[0069] La introducción de un constructo de ADN o vector en una célula hospedadora incluye técnicas como transformación, electroporación, microinyección nuclear, transducción, transfección, p. ej., lipofección mediada y transfección mediada por DEAE-Dextrina; incubación con precipitado de fosfato cálcico y ADN; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN y fusión de protoplastos. Las técnicas de transformación general son conocidas en la técnica. Ver, p. ej., Sambrook *et al.* (2001 *supra*). Se describe la expresión de la proteína heteróloga en *Trichoderma*, por ejemplo, en Patente estadounidense Núm. 6.022.725. También se hace referencia a Cao *et al.* (2000) *Science* 9:991-1001 para la transformación de cepas *Aspergillus*. Normalmente, los transformantes estables se pueden construir con sistemas de vectores donde el ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa se integra de manera estable en un cromosoma de una célula hospedadora. A continuación, se seleccionan y purifican los transformantes con técnicas conocidas.

[0070] La preparación de *Trichoderma* sp. para transformación, por ejemplo, puede suponer la preparación de protoplastos de micelios de hongos. Ver Campbell *et al.* (1989) *Curr. Genet.* 16: 53-56. Los micelios se pueden obtener de esporas vegetativas germinadas. Los micelios están tratados con una enzima que digiere la pared celular, resultando en protoplastos. Los protoplastos están protegidos por la presencia de un estabilizador osmótico en el medio de suspensión. Estos estabilizadores incluyen sorbitol, manitol, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y similares. Normalmente, la concentración de estos estabilizadores varía entre 0,8 M y 1,2 M, p. ej., se puede utilizar una solución de sorbitol de 1,2 M en el medio de suspensión.

[0071] La absorción de ADN en la cepa de la hospedadora *Trichoderma* sp. depende de la concentración de iones de calcio. Normalmente, se utiliza alrededor de 10-50 mM CaCl_2 en una solución de absorción. Compuestos adicionales apropiados incluyen un sistema de amortiguación, como TE buffer (10 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA) o 10 mM MOPS, pH 6,0 y polietilenglicol. El polietilenglicol fusiona las membranas celulares, permitiendo así que los contenidos del medio se distribuyan al citoplasma de la cepa de *Trichoderma* sp. Frecuentemente, esta fusión deja múltiples copias del DNA que están integrados en el cromosoma hospedador.

5 **[0072]** Normalmente, la transformación de *Trichoderma* sp. utiliza protoplastos o células que han estado sujetas a un tratamiento de permeabilidad, normalmente, a una densidad de 10^5 a 10^7 /mL, particularmente 2×10^6 /mL. Un volumen de 100 μ L de estos protoplastos o células en una solución apropiada (p. ej., 1,2 M de sorbitol y 50 mM CaCl₂) puede mezclarse con el ADN deseado. Generalmente, se añade una alta concentración de PEG a la solución de absorción. Se puede añadir un volumen de 0,1 a 1 de 25 % PEG 4000 a la suspensión de protoplasto; sin embargo, es útil añadir alrededor de 0,25 % de volumen a la suspensión de protoplasto. Los aditivos, como dimetilsulfóxido, heparina, espermidina, cloruro de potasio y similares, también se pueden añadir a la solución de absorción para facilitar transformación. Procedimientos similares están disponibles para otras células hospedadoras fúngicas. Ver, p. ej., Patente estadounidense Núm. 6.022.725.

10 Expresión

[0073] Un método de producción de una glucosiltransferasa puede comprender el cultivo de una célula hospedadora como se describe anteriormente, en condiciones favorables para la producción de la enzima; y el recubrimiento de la enzima de las células y/o del medio de cultivo.

15 **[0074]** El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional apropiado para el cultivo de la célula hospedadora en cuestión y para la obtención de la expresión de una glucosiltransferasa. Los medios adecuados han sido comercializados por proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las fórmulas publicadas (p. ej., como las descritas en los catálogos de la American Type Culture Collection).

20 **[0075]** Una enzima segregada de las células hospedadoras puede utilizarse en una preparación de caldo completo. En los métodos presentes, la preparación de un caldo de fermentación entero usado de un microorganismo recombinante puede conseguirse utilizando cualquier método de cultivo conocido en la técnica resultando en la expresión de una glucosiltransferasa. Por lo tanto, puede entenderse que la fermentación comprende un cultivo de frasco de agitación, una fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, alimentadas o en estado sólido) en fermentadores industriales o de laboratorio que se realiza en un medio apropiado y en condiciones que permiten que la glucosiltransferasa se exprese o aisle. El término «caldo de fermentación entero usado» se define en el presente documento como contenidos no fraccionados de material de fermentación que incluye medio cultural, proteínas extracelulares (p. ej., enzimas) y biomasa celular. Se entiende que el término «caldo de fermentación entero usado» también abarca biomasa celular que se ha roto o permeabilizado utilizando métodos conocidos en la técnica.

25

30 **[0076]** Una enzima segregada de las células hospedadoras puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo mediante procesos muy conocidos, incluyendo la separación de las células del medio mediante centrifugación o filtración, y la precipitación de componentes proteínicos del medio mediante una sal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

35 **[0077]** El polinucleótido que codifica una glucosiltransferasa en un vector puede estar ligado de forma operativa a una secuencia de control capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de codificación por parte de la célula hospedadora, p. ej., el vector es un vector de expresión. Se pueden modificar las secuencias de control, por ejemplo mediante la adición de nuevos elementos de regulación transcripcional para que el nivel de transcripción dirigido por las secuencias de control responda mejor a los moduladores de transcripción. Las secuencias de control pueden comprender promotores en particular.

40 **[0078]** Se pueden cultivar las células hospedadoras en condiciones que permitan la expresión de una glucosiltransferasa. La expresión de las enzimas puede ser constitutiva, de manera que se produzcan continuamente, o inducible, requiriendo un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de expresión inducible, se puede iniciar la producción de proteínas cuando se requiere, por ejemplo, añadiendo una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo, dexametasona, IPTG o soforosa. Los polipéptidos también se pueden producir de forma recombinante en un sistema in vitro libre de células, como el sistema de reticulocitos de conejo TNT™ (Promega).

45

50 **[0079]** Un hospedador de expresión también se puede cultivar en el medio apropiado para el hospedador, en condiciones aeróbicas. Se pueden proporcionar un batido o una combinación de agitación y aireación, con la producción a la temperatura adecuada para el hospedador, p. ej., desde unos 25 °C a unos 75 °C (p. ej., 30 °C a 45 °C), dependiendo de las necesidades del hospedador y de la producción de la glucosiltransferasa deseada. Se puede producir el cultivo desde unas 12 a unas 100 horas o más (y cualquier valor horario entre, p. ej., 24 a 72 horas) Normalmente, el caldo de cultivo está en un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, otra vez dependiendo de las condiciones de cultivo necesarias para el hospedador relativo a la producción de una glucosiltransferasa.

Métodos para enriquecer y purificar glucosiltransferasas

[0080] Las técnicas de fermentación, separación y concentración son conocidas en la técnica y se pueden utilizar métodos convencionales para preparar una solución de glucosiltransferasa que contiene polipéptidos.

5 **[0081]** Después de la fermentación, se obtiene un caldo de fermentación, se eliminan las células microbianas y varios sólidos en suspensión, incluyendo materias primas residuales para fermentación, mediante técnicas de separación convencionales para obtener una solución de glucosiltransferasa. Se utilizan, de forma general, filtración, centrifugación, microfiltración, filtración de vacío rotatoria, ultrafiltración, centrifugación seguida de ultrafiltración, extracción o cromatografía, o similares.

10 **[0082]** Es conveniente concentrar una solución de glucosiltransferasa que contenga polipéptidos para optimizar la recuperación. El uso de soluciones no concentradas requiere un mayor tiempo de incubación para almacenar el precipitado de enzimas enriquecido o purificado.

15 **[0083]** La solución que contiene enzimas se concentra utilizando técnicas de concentración convencionales hasta que se obtiene el nivel de enzima deseado. La concentración de la solución que contiene enzimas se puede conseguir mediante cualquiera de las técnicas tratadas en el presente documento. Los métodos de enriquecimiento y purificación ejemplares incluyen, pero sin carácter limitativo, filtración de vacío rotatoria y/o ultrafiltración.

[0084] La solución de enzimas se concentra en una solución concentrada de enzimas hasta que la actividad de las enzimas de la solución concentrada de glucosiltransferasa que contiene polipéptidos está a un nivel deseado.

20 **[0085]** La concentración puede llevarse a cabo utilizando, *p. ej.* un agente precipitante, como un agente precipitante de haluro metálico. Los agentes precipitantes de haluro metálico incluyen, pero sin carácter limitativo, cloruros metálicos alcalinos, bromuros metálicos alcalinos y mezclas de dos o más de estos haluros metálicos. Haluros metálicos ejemplares incluyen, cloruro de sodio, cloruro de potasio, bromuro de sodio, bromuro de potasio y mezclas de dos o más de estos haluros metálicos. El agente precipitante de haluro metálico, cloruro de sodio, también se puede utilizar como conservante.

25 **[0086]** El agente precipitante de haluro metálico se utiliza en una cantidad efectiva para precipitar una glucosiltransferasa. La selección de, al menos, una cantidad efectiva y una cantidad óptima de haluro metálico efectivo para causar la precipitación de la enzima, así como las condiciones de la precipitación para la recuperación máxima incluyendo tiempo de incubación, pH, temperatura y concentración de enzima, serán rápidamente patentes para expertos en la materia, después de una prueba rutinaria.

30 **[0087]** De forma general, se añade, al menos, alrededor de 5 % p/v (peso/volumen) a alrededor de 25 % p/v de haluro metálico a la solución concentrada de enzima, y, normalmente, al menos 8 % p/v. De forma general, no se añade más de alrededor de 25 % p/v de haluro metálico a la solución concentrada de enzima y, normalmente, no más de alrededor 20 % p/v. La concentración óptima del agente precipitante de haluro metálico dependerá, entre otros, de la naturaleza del polipéptido de glucosiltransferasa específico y en la concentración de la solución concentrada de enzima.

35 **[0088]** Otra forma alternativa de precipitar la enzima es utilizar compuestos orgánicos. Agentes precipitantes de compuestos orgánicos ejemplares incluyen: Ácido 4-hidroxibenzoico, sales de metales alcalinos de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres de alquilo de ácido 4-hidroxibenzoico y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. La adición de agentes precipitantes de compuestos orgánicos puede tener lugar antes de, simultáneamente a o después de la adición de agentes precipitantes de haluros metálicos, y la adición de agentes precipitantes, compuestos orgánicos y haluros metálicos puede llevarse a cabo de manera secuencial o simultánea.

40

[0089] De forma general, los agentes precipitantes orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en sales de metales alcalinos de ácido 4-hidroxibenzoico, como sales de sodio o de potasio, y ésteres de alquilo lineales o ramificados de ácido 4-hidroxibenzoico, donde el grupo de alquilo contiene de 1 a 12 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Los agentes precipitantes de compuestos orgánicos pueden ser, por ejemplo, ésteres de alquilo lineales o ramificados de ácido 4-hidroxibenzoico, donde el grupo de alquilo contiene de 1 a 10 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Compuestos orgánicos ejemplares son ésteres de alquilo lineales de ácido 4-hidroxibenzoico, donde el grupo alquilo contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. También se pueden utilizar ésteres de metilo de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres de propilo de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres de butilo de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres de etilo de ácido 4-hidroxibenzoico y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Compuestos orgánicos adiciones también incluyen, pero sin carácter limitativo, éster de metilo de ácido

45

50

4-hidroxibenzoico (llamado metilo PARABEN), éster de propilo de ácido 4-hidroxibenzoico (llamado propilo PARABEN), que también son ambos agentes conservadores. Para más descripciones, ver, *p. ej.*, Patente estadounidense Núm. 5.281.526.

5 **[0090]** La adición del agente precipitante de compuesto orgánico proporciona la ventaja de alta flexibilidad de las condiciones precipitantes con respecto a pH, temperatura, concentración de glucosiltransferasa, concentración de agentes precipitantes y tiempo de incubación.

10 **[0091]** Se utiliza el agente precipitante de compuesto orgánico en una cantidad efectiva para mejorar la precipitación de la enzima por medio del agente precipitante de haluro metálico. La selección de, al menos, una cantidad efectiva y una cantidad óptima de agente precipitante de compuesto orgánico, además de las condiciones de la precipitación para la recuperación máxima incluyendo tiempo de incubación, pH, temperatura y concentración de la enzima, serán patentes para los expertos en la materia, teniendo en cuenta la descripción presente, después de prueba rutinaria.

15 **[0092]** De forma general, se añade al menos alrededor de 0,01 % p/v de agente precipitante de compuesto orgánico a la solución concentrada de enzima y, normalmente, al menos alrededor de 0,02 % p/v. De forma general, no se añade más de alrededor de 0,3 % p/v de agente precipitante de compuesto orgánico a la solución concentrada de enzima y, normalmente, no más de alrededor de 0,2 p/v.

20 **[0093]** La solución concentrada de polipéptido, que contiene el agente precipitante de haluro metálico y el agente precipitante de compuesto orgánico, puede ajustarse a un pH, que, necesariamente, dependerá, de la enzima que se vaya a enriquecer o purificar. De forma general, el pH se ajusta a un nivel cercano al punto isoeléctrico de la glucosiltransferasa. El pH se puede ajustar a un pH en un rango de unas 2,5 unidades de pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) hasta unas 2,5 unidades de pH por encima del punto isoeléctrico.

25 **[0094]** El tiempo de incubación necesario para obtener un precipitado enzimático enriquecido o purificado depende de la naturaleza de la enzima específica, la concentración de enzima, y el(los) agente(s) precipitante(s) y su concentración. De forma general, el tiempo efectivo para precipitar la enzima es entre 1 y 30 horas aproximadamente; normalmente, no sobrepasa las 25 horas aproximadamente. En presencia del agente precipitante de compuesto orgánico, el tiempo de incubación puede aún reducirse a menos de, aproximadamente, 10 horas y, en la mayoría de casos, reducirse incluso a 6 horas.

30 **[0095]** De forma general, la temperatura durante la incubación está entre unos 4 °C y unos 5 °C. Normalmente, el método se lleva a cabo a una temperatura entre unos 10 °C y unos 45 °C (*p. ej.*, entre unos 20 °C y unos 40 °C). La temperatura óptima para inducir la precipitación varía de acuerdo con las condiciones de la solución y la enzima o el(los) agente(s) precipitante(s) utilizados.

35 **[0096]** La recuperación total del precipitado enzimático enriquecido o purificado, y la eficiencia con la que el proceso se lleva a cabo, se mejora mediante la agitación de la solución que comprende la enzima, el haluro metálico añadido y el compuesto orgánico añadido. El paso de agitación se realiza durante la adición del haluro metálico y del compuesto orgánico, y durante el período de incubación subsecuente. Los métodos de agitación apropiados incluyen agitación mecánica, batida, aireación vigorosa, o cualquier técnica similar.

40 **[0097]** Después del período de incubación, la enzima enriquecida o purificada se separa entonces del pigmento separado y de otras impurezas, y se recoge mediante técnicas de separación convencionales, como filtración, centrifugación, microfiltración, filtración de vacío rotatoria, ultrafiltración, filtración prensa, microfiltración de membrana cruzada, microfiltración de membrana de flujo cruzado, o similares. Se puede obtener un mayor enriquecimiento o purificación del precipitado enzimático lavando el precipitado con agua. Por ejemplo, el precipitado enzimático enriquecido o purificado se lava con agua que contiene el agente precipitante de haluro metálico, o con agua que contiene el haluro metálico y los agentes precipitantes de compuestos orgánicos.

45 **[0098]** Durante la fermentación, se acumula un polipéptido de glucosiltransferasa en el caldo de cultivo. Para el aislamiento, enriquecimiento o purificación de la glucosiltransferasa deseada, el caldo de cultivo se centrifuga o filtra para eliminar células, y el líquido sin células resultante se utiliza para el enriquecimiento o purificación de la enzima. En una forma de realización, el caldo sin células está sujeto a precipitación por salado utilizando sulfato de amonio a alrededor de 70 % de saturación; la fracción de saturación-precipitación 70 % se disuelve luego en un tampón y se aplica a una columna, como a una columna Sephadex G-100, y se eluye para recuperar la fracción enzimática activa. Para un mayor enriquecimiento o purificación, se puede utilizar un procedimiento convencional como cromatografía de intercambio iónico.

50

[0099] Las enzimas enriquecidas o purificadas se pueden convertir en un producto final que sea o bien líquido (solución, lodo) o bien sólido (granulado, polvo).

[0100] Se describe un ejemplo más específico de enriquecimiento o purificación en Sumitani et al. (2000) "New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of Bacillus sp. 195 α -amylase contributes to starch binding and raw starch degrading," Biochem. J. 350: 477-484 y se resume brevemente en el presente documento. La enzima obtenida de 4 litros de un cultivo sobrenadante de *Streptomyces lividans* TK24 se trata con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80 % de saturación. Se recupera el precipitado mediante centrifugación a $10\,000 \times g$ (20 min. y 4°C) y se vuelve a disolver en un tampón 20 mM Tris/HCl (pH 7,0) que contiene 5 mM CaCl_2 . El precipitado solubilizado se dializa entonces contra el mismo tampón. La muestra dializada se aplica entonces a una columna Sephacryl S-200, que se ha equilibrado previamente con un tampón 20 mM Tris/HCl buffer, (pH 7,0), 5 mM CaCl_2 y se ha eluido a una velocidad de flujo lineal de 7 mL/hr con el mismo tampón. Las fracciones de la columna se recopilan y evalúan por actividad según se juzga por el ensayo enzimático y la SDS-PAGE. La proteína se purifica más de la siguiente manera. Una columna Toyopearl HW55 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA; Cat. Núm. 19812) se equilibra con un tampón 20 mM Tris/HCl (pH 7.0) que contiene 5 mM CaCl_2 y 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La enzima se elude con un gradiente lineal de 1,5 a 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un tampón 20 mM Tris/HCL, pH 7,0 que contiene 5 mM CaCl_2 . Se recogen las fracciones activas y la enzima precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80 % de saturación. Se recupera el precipitado, se vuelve a disolver y se dializa como se describe anteriormente. La muestra dializada se aplica entonces a una columna Mono Q HR5/5 (Amersham Pharmacia; Cat. Núm. 17-5167-01) equilibrada previamente con un tampón 20 mM Tris/HCl (pH 7.0) que contiene 5 mM CaCl_2 , a un caudal de 60 mL/hora. Las fracciones activas se juntan y se añaden a una solución de 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las fracciones de enzimas activas se recromatografían en una columna Toyopearl HW55, como antes, para obtener una enzima homogénea como la que determina SDS-PAGE. Ver Sumitani et al. (2000) Biochem. J. 350: 477-484 para una exposición general sobre el método y sus variaciones.

[0101] Para la recuperación de la escala de producción, los polipéptidos de glucosiltransferasa pueden purificarse parcialmente o enriquecerse, como se describe anteriormente de forma general, eliminando las células a través de floculación con polímeros. De forma alternativa, la enzima se puede enriquecer o purificar por microfiltración seguida de concentración por ultrafiltración utilizando membranas y equipo disponibles. Sin embargo, para algunas aplicaciones, la enzima no necesita enriquecerse o purificarse, y el caldo de cultivo entero se puede romper y se puede utilizar sin ningún otro tratamiento. La enzima puede entonces procesarse, por ejemplo, en gránulos.

[0102] La presente información dada a conocer proporciona una estrategia para generar fibras insolubles en zumos de fruta utilizando una glucosiltransferasa. La glucosiltransferasa utiliza un sustrato de sacarosa y produce polímeros alfa (1-3) glucano, además de leucosa, fructosa y oligosacáridos cortos. Como los glucanos (1-3) alfa resultantes no son digeridos por las enzimas humanas, se mejora la bebida resultante.

[0103] La glucosiltransferasa es la de *Streptococcus salivarius* (SEQ ID NO: 1) o cualquiera 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % idéntica a la enzima. En algunas formas de realización, se puede inmovilizar la enzima, que puede facilitar el uso repetido. Por ejemplo, la enzima se puede inmovilizar en un soporte sólido, y los líquidos de interés (p. ej., zumos) fluyeron a través del soporte sólido, efectuando así la conversión de sacarosa a polímeros alfa (1-3) glucano. Estos polímeros alfa (1-3) glucano pueden retenerse, permitiendo así que el flujo del zumo se clarifique. De forma alternativa, polímeros alfa (1-3) glucano se pueden liberar en el flujo del zumo, proporcionando así fibras insolubles del zumo resultante.

Ejemplo:

[0104] La SEQ ID NO: 1 se expresó y purificó de *E. Coli* utilizando métodos convencionales (ver, por ejemplo, Microbiology (1995), 141, 1451-1460), y se exploró en los experimentos representados en las Figuras 1A-1B y 2. En la figura 1A-1B, se trató el zumo de naranja con GTFJ natural. El reactivo Simply Orange TM se diluyó 1:1 con NaOAc, pH 5.5 y se analizó. El nivel de sacarosa se redujo en un 80% en el equilibrio. Hubo alrededor de un 30% de pérdida de dulzura, aunque esto podría ser una sobreestimación debido a la formación de otros azúcares (p. ej., la leucosa). La figura 2 muestra la producción de fibra insoluble sustancial, generando alrededor de 4,4, alfa-glucano por litro de OJ. Esto provoca la reducción del índice glucémico, reduce las calorías y, probablemente, implica un pequeño cambio de viscosidad. La muestra de no GTFJ se muestra en el tubo izquierdo, y el tubo de 105 ug/ml GTFJ de 4 horas está en la derecha.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una bebida baja en calorías y alta en fibras insolubles comprendiendo; tratamiento de una bebida que contiene sacarosa con una glucosiltransferasa para convertir sacarosa en alfa (1-3) glucano para producir la bebida baja en calorías y alta en fibras insolubles; donde el tratamiento comprende tratamiento con una enzima presentando, al menos, 80% de identidad de secuencia con la glucosiltransferasa que presenta la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO: 1 y donde la bebida comprende un nivel de sacarosa reducido en, al menos, un 30 %.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 comprende, además, la eliminación de alfa (1-3) glucano para producir una bebida baja en calorías y clarificada.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la bebida baja en calorías y alta en fibras insolubles contiene no menos de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de fructosa de la bebida que contiene sacarosa.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tratamiento comprende tratamiento con una glucosiltransferasa que comprende SEQ ID NO: 1.
- 25 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tratamiento comprende tratamiento con una enzima que presenta, al menos, una identidad de secuencia de 85 % 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % con la glucosiltransferasa que presenta la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ. ID NO: 1.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tratamiento comprende tratamiento con una glucosiltransferasa inmovilizada.
- 35 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tratamiento comprende tratamiento con una glucosiltransferasa inmovilizada de *Streptococcus salivarius*.
- 40 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la bebida comprende un zumo de frutas.
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la bebida comprende zumo de manzana o zumo de naranja.
- 10 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la bebida comprende un nivel de sacarosa reducido, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 % o al menos 90 % comparado con una bebida control que carece de tratamiento.
- 15 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la bebida comprende al menos 2, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4 o al menos 4,3 gramos de glucanos (1-3) alfa por litro.
- 20 12. El método de la reivindicación 11, donde la bebida es zumo de naranja o zumo de manzana, y donde contiene no menos del 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de fructosa de un zumo de naranja o zumo de manzana promedio.

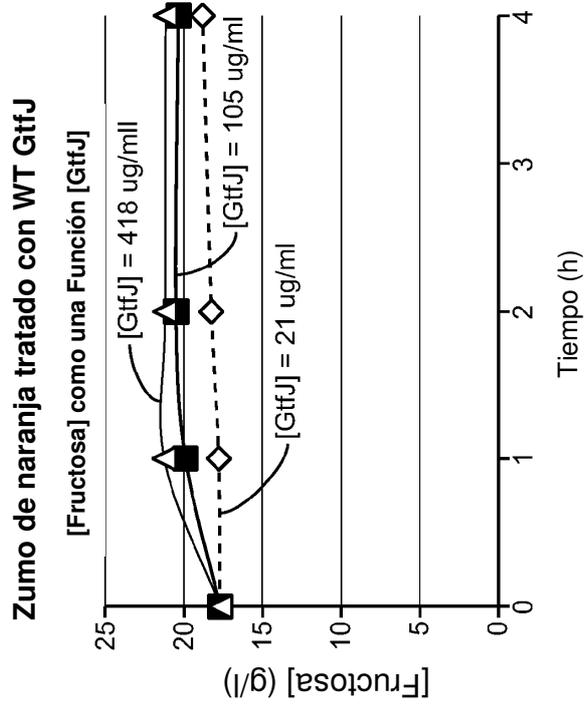


FIG. 1B

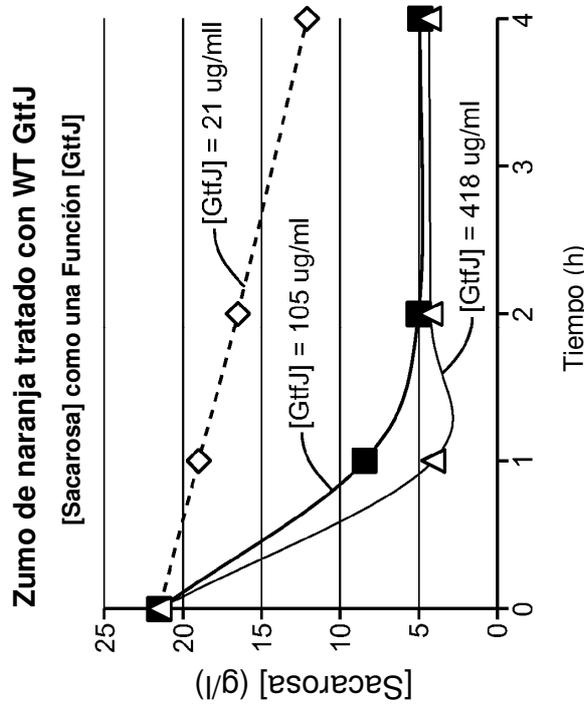


FIG. 1A

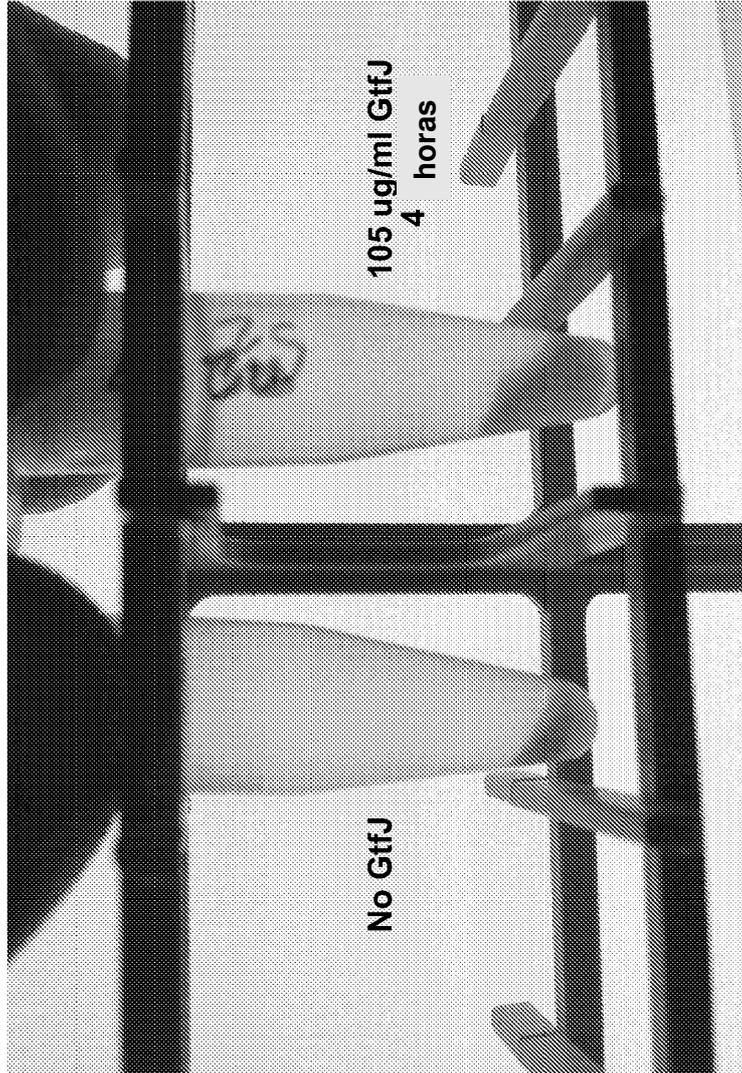


FIG. 2