



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 359 545**

② Número de solicitud: 200930929

⑤ Int. Cl.:
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **24.10.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
24.05.2011

⑦ Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
Ciudad Universitaria de Cantoblanco
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Fernández Lobato, María y
Álvaro Benito, Miguel**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Fructofuranosidasa mejorada genéticamente para la obtención del prebiótico 6-kestosa.**

⑤ Resumen:

Fructofuranosidasa mejorada genéticamente para la obtención del prebiótico 6-kestosa.

La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica derivada de SEQ ID NO: 1 de *Schwanniomyces occidentalis*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232. Asimismo, la presente invención se refiere al uso de dicha secuencia nucleotídica, al uso del vector de expresión, al uso del producto de expresión o al uso de la célula, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión. Preferiblemente el sistema heterólogo se expresa en *Saccharomyces cerevisiae*. Además, la presente invención se refiere a un método para la obtención de dicho producto enzimático, al producto enzimático con actividad fructofuranosidasa obtenible por dicho método. Preferiblemente dicho producto enzimático es capaz de producir fructooligosacáridos como por ejemplo 6-kestosa y 1-kestosa.

ES 2 359 545 A1

DESCRIPCIÓN

Fructofuranosidasa mejorada genéticamente para la obtención del prebiótico 6-kestosa.

5 La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica derivada de SEQ ID NO: 1 de *Schwanniomyces occidentalis*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232. Asimismo, la presente invención se refiere a un vector que comprende dicha secuencia nucleotídica, al producto de expresión de dicha secuencia nucleotídica o a la célula que los comprende en
10 cualquiera de sus combinaciones. Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de dicha secuencia nucleotídica, al uso del vector de expresión, al uso del producto de expresión o al uso de la célula, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión. Preferiblemente el sistema heterólogo se expresa en *Saccharomyces cerevisiae*. Además, la presente invención se refiere a un método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa. Por último la presente invención se refiere al producto enzimático con actividad fructofuranosidasa obtenible por dicho método así como a un método para
15 la obtención de oligosacáridos. Preferiblemente dicho producto enzimático es capaz de producir fructooligosacáridos. Más preferiblemente, los fructooligosacáridos tienen enlaces β -1,2, y β -2,6 y aún más preferiblemente, son 6-kestosa y 1-kestosa.

20 Estado de la técnica anterior

Las moléculas prebióticas líderes en el mercado europeo son los fructooligosacáridos (FOS) (Sangeetha *et al.*, 2005. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 442-457). Los FOS, resisten la digestión en la parte superior del tracto intestinal, se metabolizan por las bacterias endógenas del colon y estimulan su crecimiento (Rao, 1998. *J. Nutr.* 80: 1442S-1445S). Los efectos de estas moléculas sobre la persona que los consume son muy variados: reducción de los episodios de diarreas causadas por rotavirus; mejora de los síntomas de la intolerancia a la lactosa; control del estreñimiento por aumento de la masa fecal; aumento de la absorción de calcio, y en consecuencia una reducción del riesgo de osteoporosis; disminución de la capacidad mutagénica de ciertas enzimas microbianas como la nitro-reductasa, asociadas con el cáncer de colon; posible reducción de enfermedades relacionadas con dislipemias, etc.

30 Los FOS que se comercializan actualmente pertenecen a la serie ¹F, están formados por moléculas de fructosa unidas por enlaces β ,2-1, con una molécula de glucosa en un extremo (Yun, 1996. *Enzyme Microb. Technol.*, 19: 107-117); se abrevian como GF_n, donde *n* está por lo general comprendido entre 2 y 4 unidades de fructosa (1-kestosa, nistosa y fructosilnistosa). Hay interés industrial en la búsqueda de nuevos FOS con actividad prebiótica mejorada. Los fructooligosacáridos de la serie ⁶F, consisten en moléculas de fructosa unidas por enlaces β ,2-6, con una molécula de glucosa en el extremo no reductor. Generalmente se obtienen mediante hidrólisis ácida a partir del polímero levano. Por vía sintética, se ha descrito la formación de FOS de la serie ⁶F como producto minoritario en la formación de 1-kestosa a partir de la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* (M. Bekers *et al.*, 2002. *Process Biochem.*, 38: 701-706).

40 Es conocido que el uso de una fructofuranosidasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* (también conocida como *Debaryomyces occidentalis*) para la producción de FOS, que produce principalmente 6-kestosa, y 1-kestosa como producto secundario (WO/2007/074187). Utilizando como sustrato sacarosa a 600 g L⁻¹ se obtuvo un nivel de producción máximo de FOS a las 24 h de reacción, y fue de 101 g L⁻¹ de los 76 g L⁻¹ son 6-kestosa, con una conversión total de sacarosa del 64%, (Álvaro-Benito *et al.*, 2007. *J. Biotechnol.*, 132(1): 75-81).

45 Por tanto, a pesar ser conocidos métodos de producción de oligosacáridos prebióticos, debido a la importancia industrial de los mismos, la mejora de su producción, mediante un proceso eficaz y viable industrialmente, es un aspecto pendiente de resolver en la actualidad.

50 Explicación de la invención

La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica derivada de SEQ ID NO: 1 de *Schwanniomyces occidentalis*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232. Asimismo, la presente invención se refiere a un vector que comprende dicha secuencia nucleotídica, al producto de expresión de dicha secuencia nucleotídica o a la célula que los comprende en
55 cualquiera de sus combinaciones. Por otra parte, la presente invención se refiere al uso de dicha secuencia nucleotídica, al uso del vector de expresión, al uso del producto de expresión o al uso de la célula, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión. Preferiblemente el sistema heterólogo se expresa en *Saccharomyces cerevisiae*. Además, la presente invención se refiere a un método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa. Por último la presente invención se refiere al producto enzimático con actividad fructofuranosidasa obtenible por dicho método así como a un método para la obtención de oligosacáridos. Preferiblemente dicho producto enzimático es capaz de producir fructooligosacáridos. Más preferiblemente, los fructooligosacáridos tienen enlaces β -1,2, y β -2,6 y aún más preferiblemente, son 6-kestosa y 1-kestosa. El producto enzimático de la presente invención presenta una alta actividad específica, siendo candidatos
65 idóneos para generar 6-kestosa como principal producto de transglucosilación.

ES 2 359 545 A1

La presente invención se encuadra dentro del campo de la industria biotecnológica y, en particular, en el sector agroalimentario dedicado a la obtención de oligosacáridos prebióticos para ser utilizados como ingredientes funcionales en productos dietéticos, productos lácteos, alimentos infantiles y alimentos para animales. También se relaciona con el campo de la industria farmacéutica y cosmética.

5

En la presente invención, los productos enzimáticos nuevos producen aproximadamente 6 veces más 6-kestosa que la proteína nativa (sin modificar) en las mismas condiciones. Este aumento se relaciona con la modificación de la posición 196 de la proteína nativa (cuyo código genético no es el estándar), donde se sustituye el aminoácido Serina por Leucina (S196L) y con la sustitución de la posición Asparragina 52 por Serina (N52S) y Prolina 232 por Valina (P232V). Es decir, debido a la lectura del código genético del microorganismo *S. occidentalis*, en la posición 196 de dicha secuencia aminoacídica, hay una Serina. Cuando la secuencia nucleotídica que codifica para esta secuencia aminoacídica, procedente de *S. occidentalis*, se expresa en un sistema heterólogo que interpreta el código genético estándar, se inserta una Leucina en la posición 196 en el proceso de traducción. Esta secuencia con Leucina en la posición 196 es la que ha sido citada en el documento de patente WO/2007/074187. En la presente invención se demuestra que dicha secuencia con una Leu en la posición 196 es mucho más efectiva en la producción de 6-kestosa que una secuencia que tiene Serina en dicha posición (al igual que en la proteína nativa) cuando son expresadas ambas en un sistema heterólogo de expresión. Además, la sustitución del aminoácido Asparragina en la posición 52 por Serina (N52S) y la sustitución de Prolina en la posición 232 por Valina (P232V), en la secuencia que tiene una Leucina en la posición 196, mejora significativamente la eficacia en la producción del prebiótico 6-kestosa.

20

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica derivada de SEQ ID NO: 1 de *Schwanniomyces occidentalis*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232.

25

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica cuya transcripción origine un ARN mensajero y su posterior traducción a la secuencia de aminoácidos. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos. Una realización más preferida se refiere a la secuencia nucleotídica, donde dicha secuencia, que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, es SEQ ID NO: 3.

30

La secuencia SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 1 de *Schwanniomyces occidentalis*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52.

35

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 4. Según una realización más preferida de la secuencia nucleotídica, dicha secuencia nucleotídica, que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4, es SEQ ID NO: 5.

40

La secuencia SEQ ID NO: 4 corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 1 de *Schwanniomyces occidentalis*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232.

45

En adelante, para hacer referencia a cualquiera de las secuencias nucleotídicas descritas en los párrafos anteriores, se puede usar la expresión “secuencia nucleotídica de la presente invención” o “secuencia nucleotídica de la invención”.

50

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica de la invención. En adelante, para referirse al vector de expresión, se puede emplear la expresión “vector de la presente invención” o “vector de la invención”.

55

El término “vector de expresión” se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término lo indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender la secuencia nucleotídica de la invención que, fusionadas al mismo puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector. Preferiblemente el vector de expresión es capaz de expresarse en un microorganismo tipo levadura. Más preferiblemente el vector es un vector de la serie pYES o pYC, capaces de expresarse en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

60

Otro aspecto de la presente invención es el producto de expresión de la secuencia nucleotídica de la invención, o del vector de la invención. El término “producto de la expresión” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia se entiende, por ejemplo, el ARN que se obtiene de la transcripción de la secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción del ARN modificada postraduccionalmente o no, o posteriores modificaciones de la secuencia nucleotídica en el interior de la célula siempre

65

ES 2 359 545 A1

que la secuencia resultante tenga su origen en la secuencia original transferida o no pierda la característica funcional que la caracteriza en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es una célula que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, o el vector de la invención o el producto de expresión de la secuencia nucleotídica de la invención, o cualquiera de las combinaciones de secuencia nucleotídica, vector de expresión o producto de expresión. En adelante, para referirse a dicha célula, se puede emplear la expresión “célula de la presente invención” o “célula de la invención”. El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

La célula transformada con un vector que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico, o permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos al medio de cultivo o por medio de la no adición al medio de cultivo de algún aminoácido esencial para el metabolismo de dicha célula. En el primer caso, la resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia comprendida en la secuencia del vector. En el segundo caso, las células transformadas con el vector de la invención deben ser auxótrofas para un determinado aminoácido esencial y el vector de expresión debe comprender al menos una secuencia que codifique para dicho aminoácido.

Un aspecto más de la presente invención es el uso de la secuencia nucleotídica de la invención, del vector de la invención, de la célula de la invención, o del producto de expresión de la secuencia nucleotídica de la invención, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión.

El término “producto enzimático con actividad fructofuranosidasa” se refiere a una enzima identificada cuya actividad es identificada con el número EC 3.2.1.26, es decir, dicho número ha sido asignado por la *Enzyme Commission number* de acuerdo a las reacciones químicas que cataliza (*IUBMB Enzyme Nomenclature, CAS Registry Number 9001-42-7*). La enzima capaz de llevar a cabo este tipo de reacción química se denomina Beta-fructofuranosidasa (β -fructofuranosidasa) o alternativamente invertasa o sacarasa. Dicha enzima es capaz de hidrolizar la sacarosa en fructosa y glucosa. Esta enzima también es capaz de catalizar reacciones fructotransferasa (transfructosidasa).

El término “sistema heterólogo de expresión” tal como se emplea en la presente invención hace referencia a un sistema de expresión que comprende las herramientas necesarias para que la secuencia nucleotídica, el vector o la célula de la invención pueda transcribirse y traducirse en una secuencia aminoacídica, donde dicho sistema de expresión es capaz de expresarse en una especie distinta de la especie *Schwanniomyces occidentalis* o de una especie cuyo código genético sea diferente del código genético estándar.

La expresión de la secuencia nucleotídica de la invención mediante dicho sistema de expresión heterólogo es importante ya que, de expresarse en un sistema capaz de expresar dicha secuencia en el organismo *Schwanniomyces occidentales*, el codón CUG que, según el código genético corresponde a Leucina, daría lugar a una secuencia aminoacídica diferente ya que según el código genético 12 (*Alternative Yeast Nuclear Code*), dicho triplete codifica para el aminoácido Serina.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la secuencia nucleotídica de la invención, del vector de la invención, de la célula de la invención, o del producto de expresión de la secuencia nucleotídica de la invención, donde el sistema heterólogo expresa dicha secuencia nucleotídica en al menos una célula huésped de *Saccharomyces cerevisiae*.

Además, el producto enzimático de la invención o las células de *S cerevisiae*, productoras de dicho producto, pueden usarse como tal o de manera inmovilizada, acopladas física o químicamente a un material portador.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa que comprende:

a) modificar la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 de tal forma que se obtenga una secuencia nucleotídica que codifique para una secuencia aminoacídica que presente la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232,

b) insertar al menos una secuencia nucleotídica obtenida en el paso (a) en un vector de expresión capaz de expresar dicha secuencia nucleotídica en un microorganismo que pertenece a una especie diferente de *Schwanniomyces occidentalis* (mediante dicho sistema heterólogo de expresión),

c) transformar el producto obtenido en el paso (b) al menos en una célula de dicho microorganismo, y

d) cultivar la célula obtenida en el paso (c) en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las levaduras transformadas o del sistema heterólogo seleccionado.

ES 2 359 545 A1

La transformación a la que se hace referencia en el paso (c) del método se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, transformación genética mediada por electroporación, mediante acetato de litio, etc. Mediante estas técnicas se puede conseguir introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose.

El medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las levaduras transformadas o del sistema heterólogo seleccionado es conocido por el experto en la materia y dependerá del tipo de levadura transformada (teniendo en cuenta también las auxotrofías) así como del vector de expresión. En los ejemplos de la presente invención se emplea un medio de cultivo con galactosa donde se activa la expresión del gen introducido ya que dicha secuencia nucleotídica se ha colocado bajo el control del promotor GAL.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, donde además comprende el paso e); recuperar el producto enzimático con actividad fructofuranosidasa del medio de cultivo y/o de las células del microorganismo. Dicho producto enzimático puede ser excretado por las células al medio de cultivo en el que están creciendo. El producto también puede recuperarse del interior de las células que lo producen mediante cualquier técnica que permita la lisis de dichas células o mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica que permita la salida de dicho producto enzimático de las células.

El producto enzimático crudo, resultado del anterior método de la invención, puede ser utilizado industrialmente para la obtención de oligosacáridos sin requerir etapas de separación o purificación posteriores. No obstante, se puede proceder a la recuperación de dicho producto enzimático del medio de cultivo y/o de las células, pues la enzima objeto de la invención se libera extracelularmente de forma parcial. Así pues, en la presente invención, el producto enzimático puede encontrarse tanto en la suspensión de células con el medio de cultivo, como en la fracción celular o en la fracción libre de células. Mediante métodos convencionales, el experto en la materia escogerá el producto enzimático de partida más apropiado a cada procedimiento industrial, es decir, crudo o con más o menos nivel de purificación. La recuperación del producto enzimático con actividad fructofuranosidasa se lleva a cabo mediante técnicas que forman parte del conocimiento general común y por tanto, están disponibles a un experto en la materia. Por ejemplo, el aislamiento o recuperación del producto enzimático se lleva a cabo por ejemplo, pero sin limitarse, mediante precipitación de dicho producto con fraccionamiento salino, precipitación por calor, precipitación isoelectrica, con disolventes orgánicos o con polímeros, con acetona fría o mediante cromatografía.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, donde la secuencia aminoacídica del paso (a) es SEQ ID NO: 2. Otra realización más preferida de la presente invención es el método, donde dicha secuencia nucleotídica, que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, es SEQ ID NO: 3.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, donde la secuencia aminoacídica del paso (a) es SEQ ID NO: 4. Una realización más preferida es el método, donde dicha secuencia nucleotídica, que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4, es SEQ ID NO: 5.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, donde el microorganismo que pertenece a una especie diferente de *Schwanniomyces occidentalis* del paso (b) es *Saccharomyces cerevisiae*.

Según otra realización preferida del método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, el cultivo de la célula según el paso (c) se lleva a cabo a una temperatura de entre 28 y 30°C.

En adelante, para referirse a cualquiera de los métodos para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, descrito en párrafos anteriores, puede usarse la expresión "método de la presente invención" o "método de la invención".

Otro aspecto de la presente invención es el producto enzimático con actividad fructofuranosidasa obtenible por el método de la invención. Según una realización preferida, el producto enzimático tiene actividad transfructosidasa en presencia de uno o varios sustratos glucídicos. El sustrato glucídico se selecciona de entre sacarosa, glucosa, fructosa, 6-kestosa o 1-kestosa. Preferiblemente el sustrato glucídico es sacarosa.

Otra realización preferida se refiere al producto enzimático, donde los productos resultantes de la actividad transfructosidasa son fructooligosacáridos. Una realización más preferida se refiere al producto enzimático donde los productos resultantes de la actividad transfructosidasa son fructooligosacáridos con enlaces β -1,2, y β -2,6. Según otra realización aún más preferida, los fructooligosacáridos con enlaces β -1,2, y β -2,6 son 6-kestosa y 1-kestosa. Además de la actividad fructofuranosidasa, el producto enzimático de la invención tiene actividad transfructosidasa. Los productos resultantes de la actividad transfructosidasa son, entre otros, fructooligosacáridos de la serie ⁶F (en particular 6-kestosa) y muy minoritariamente de la serie ¹F (en particular 1-kestosa).

En adelante, para referirse a cualquiera de los productos enzimáticos con actividad fructofuranosidasa obtenible por el método de la invención, descrito en párrafos anteriores, puede usarse la expresión “producto enzimático de la presente invención” o “producto enzimático de la invención”.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de oligosacáridos que comprende:

a) poner en contacto, *in vitro*, el producto enzimático de la invención con al menos un sustrato glucídico, e

b) incubar la mezcla descrita en el paso (a).

10

La incubación de la mezcla del paso (b) se lleva a cabo mediante condiciones óptimas para una enzima fructofuranosidasa. Un ejemplo de dichas condiciones se muestra en la tabla 5 de los ejemplos de la presente invención.

15 Una realización preferida se refiere al método para la obtención de oligosacáridos, que además comprende el paso c); recuperar los oligosacáridos obtenidos tras la incubación descrita en el paso (b).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

Descripción de las figuras

25 Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

Fig. 1. Muestra el análisis por MALDI-TOF de la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis*.

30

Se muestra la intensidad relativa (intensidad [u.a; unidades de cuentas]) de los péptidos trípticos ionizados frente a la masa/carga (m/z) de los mismos. El sobrenadante de la digestión con tripsina se analizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF modelo Autoflex de Bruker equipado con reflector, empleando HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico) como matriz en condiciones de saturación.

35

Fig. 2. Muestra la actividad de la enzima fructofuranosidasa extracelular valorada en *S. cerevisiae* SoINV-Leu en medio de cultivo rico YPGal.

40 La levadura se precultivó en el medio mínimo SC(U)D y se creció en YPGal con agitación constante a 200 rpm y 30°C durante 28 h. Se representa el crecimiento del cultivo en UD0660 nm (círculos) y la actividad valorada en el medio extracelular, en U (cuadrados). La actividad se ensayó sobre sacarosa al 5%.

45 Fig. 3 Muestra el perfil de productos obtenidos tras la incubación de sacarosa con la enzima purificada (F-2) de SoINV-Ser.

Las condiciones de reacción son las indicadas en el texto y las condiciones de análisis mediante HPLC y los nombres de los compuestos son los mismos que en la tabla 5. El análisis corresponde a las 6 h de reacción.

50

Fig. 4. Muestra el perfil de productos obtenidos tras la incubación de sacarosa con la enzima purificada (F-2) de SoINV-Leu.

55 Las condiciones de reacción son las indicadas en el texto y las condiciones de análisis mediante HPLC y los nombres de los compuestos son los mismos que en la tabla 5. El análisis corresponde a las 72 h de reacción.

60 Fig. 5. Muestra la comparación del % total de FOS producido a lo largo de 75 h de reacción por la fructofuranosidasa de *S. occidentalis*.

Fructofuranosidasa expresada en el organismo donante (triángulos), la fructofuranosidasa expresada en *S. cerevisiae*, SoINV-Ser (cuadrados) y SoINV-Leu (rombos).

65

Fig. 6. Muestra el máximo nivel de producción de los FOS (6-kestosa y 1-kestosa) obtenido por la SoINV de *S. occidentalis* (SoI) y la expresada en *S. cerevisiae* que incluye Serina (196S) o Leucina (196L) en la posición 196 de la proteína nativa.

ES 2 359 545 A1

Fig. 7. Muestra el máximo nivel de producción de los FOS (6-kestosa y 1-kestosa) obtenido por diferentes secuencias que codifican para diferentes fructofuranosidas.

En la figura se representa SoINV de *S. occidentalis* (SoI) y la expresada en *S. cerevisiae* que incluye Serina (196S), o Leucina (196L) en la posición 196 y de esta última que incluye, además, Serina en la posición 52 en lugar de Asparragina (196L N52S) o Valina en la posición 232 en lugar de Prolina (196L P232V).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen la modificación de la secuencia amininoacídica original (SEQ ID NO: 1) y expresión de las fructofuranosidasas modificadas de *S. occidentalis* en un sistema heterólogo así como su uso para la producción de FOS.

Ejemplo 1

Modificación de la secuencia amininoacídica original (SEQ ID NO: 1) y expresión de las fructofuranosidasas modificadas de S. occidentalis en un sistema heterólogo

1.2. Estudio de la secuencia de la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis*

La Fructofuranosidasa con actividad fructosiltransferasa de *S. occidentalis* se se purificó a partir del medio extracelular de esta levadura tal y como se describió anteriormente (Álvaro-Benito *et al.*, 2007. J. Biotechnol., 132(1): 75-81). La proteína purificada se digirió con tripsina y analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC). El resultado del análisis se muestra en la Fig 1. El análisis de los péptidos trípticos fue compatible con la secuencia del gen codificante descrito en el documento de patente WO/2007/074187 salvo en lo referente al fragmento de 2005.023 m/z, marcado con una flecha en la Fig 1. La secuencia aminoacídica de dicho fragmento tríptico marcado con una flecha en la figura 1, fue determinada por espectrometría seguida de electrospray-trampa iónica y se corresponde una secuencia donde en la posición 196 de la proteína nativa hay una Serina en lugar de una Leucina tal y como correspondería con la lectura estándar del código genético, y con la secuencia citada en dicho documento de patente WO/2007/074187. Es decir, debido a la lectura del código genético del microorganismo *S. occidentalis*, en la posición 196 de dicha secuencia aminoacídica, hay una Serina. Cuando la secuencia nucleotídica que codifica para esta secuencia aminoacídica, procedente de *S. occidentalis*, se expresa en un sistema heterólogo que interpreta el código genético estándar, se inserta una Leucina en la posición 196 en el proceso de traducción.

La Serina que ocupa la posición 196 no parece formar parte, *a priori*, de los motivos estructurales implicados en la reacción catalizada por la enzima de *S. occidentalis*. De hecho, esta posición está ocupada por el aminoácido Glutámico en otras fructosiltransferasas, como en la levansucrasa de *Bacillus subtilis* (Meng y Fütterer, 2003. Nat Struct Biol., 10(11): 935-41) o la de *Gluconoazetobacter diazotrophicus* (C. Martínez-Fleites *et al.*, 2005. Biochem J., 15: 19-27).

1.2. Aislamiento del material genético que dirige la síntesis de la actividad fructofuranosidasa de *S. occidentalis*

Se amplificó el gen codificante (1.6 kb) de la actividad fructofuranosidasa de *S. occidentalis* ATCC26077, utilizando la técnica estándar de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ADN genómico de la levadura y oligonucleótidos dirigidos hacia la secuencia de los extremos de la fase de lectura abierta (ORF) del gen, ya depositada en las bases de datos (secuencia de acceso número X17604). Se obtuvo la secuencia SEQ ID NO: 1, descrita en el documento de patente WO/2007/074187. En la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1.

TABLA 1

Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen codificante para la Fructofuranosidasa de S. occidentalis

Identificador de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 6	Directo: TAGGATCCAACATGGTACAAGTTTTAAGTGTATTAG
SEQ ID NO: 7	Reverso: TATCTTCATCAATAGACTATCTAGACTTATTTAGTTCCT

En negrita se muestra la secuencia de corte de la enzima de restricción *Bam*HI y *Xba*I utilizada para el posterior clonaje del fragmento amplificado. Las secuencias se muestran de 5' a 3'.

ES 2 359 545 A1

El producto amplificado se insertó en el plásmido pstBlue1 (pstBlue1; *Perfectly cloning vector*; Novagen) y su integridad se comprobó por secuenciación utilizando oligonucleótidos dirigidos hacia la secuencia de la Fructofuranosidasa utilizando la metodología estándar (Servicio de secuenciación del SIDI, UAM). A tenor de que en la posición 196 de la proteína nativa, según se determinó por espectrometría de masas, hay una Serina en lugar de una Leucina, se indujo en ella el cambio del triplete CTG (596-598) por TCA (596-598) utilizando PCR y los oligonucleótidos 196S Fw y 196S Rv que figuran en la Tabla 2.

La Serina 196 se substituyó también por Glutámico, realizando el cambio del triplete CTG (596-598) por GAA (596-598); se utilizó PCR y los oligonucleótidos 196E Fw y 196E Rv que figuran en la Tabla 2.

TABLA 2

Oligonucleótidos empleados en la sustitución del triplete CTG por TCA y del triplete CTG por GAA del gen codificante para la Fructofuranosidasa de S. occidentalis

Identificador de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 8	196SFw: GTTGTT CT AAAATCGCAAGAGTACAAAATTCAAATTTTGG
SEQ ID NO: 9	196SRv: CGATTT CT GAACAACCATGATCCATTGATTTGAATCTTCATGC
SEQ ID NO: 10	196EFw: GTTGTT GA AAAATCGCAAGAGTACAAAATTCAAATTTTGG
SEQ ID NO: 11	196ERv: CGATTT TT CAACAACCATGATCCATTGATTTGAATCTTCATGC

En negrita se resalta el triplete sustituido. Las secuencias se muestran de 5' a 3'.

Además, utilizando una metodología similar a la anteriormente descrita se substituyeron distintos residuos aminoacídicos de la secuencia aminoacídica de la proteína SoINV-Leu (SEQ ID NO: 1), es decir, se substituyeron algunos aminoácidos de la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Se llevaron a cabo las siguientes substituciones:

- Asparragina por Serina de la posición 52. Para hacer referencia a esta substitución se puede usar el término N52S. La secuencia aminoacídica que presenta esta modificación es SEQ ID NO: 2.

- Prolina por Valina en la posición 232. Para hacer referencia a esta substitución se puede usar el término P232V. La secuencia aminoacídica que presenta esta modificación es SEQ ID NO: 4.

Para la substitución de la posición 52 ó 232 de la proteína SoINV-Leu196 se utilizó PCR, y como ADN molde el gen codificante para la fructofuranosidasa de *S. occidentalis* que contiene Leucina en la posición 196 incluido en el vector pYES2.0 obtenido tal y como se describe en el apartado correspondiente de la presente solicitud. Cada reacción incluía: 5U (1 µl) de High Fidelity Plus TM (Roche), 10 µl del tampón para esta enzima 5x, 1 µl de dNTs 40 mM, 1 µl del ADN descrito, 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos cebadores que se muestran en la tabla 3.

ES 2 359 545 A1

TABLA 3

Oligonucleótidos empleados en la sustitución de la posición 52 ó 232 de la proteína SoINV-Leu196

Identificador de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 12	N52SFw: GAATGATCCG AGT GGTCTATTCTACGATAAAACTGCTAAGCTTTG
SEQ ID NO: 13	N52SRv: GAATAGAC CACT CGGATCATTCCATCCATCCTTTTCCGGAGTAAATAC
SEQ ID NO: 14	P232VFw: TATGAATGTG T CGGTTTAATTGAAGTTCCTATTGAGAATTCAGAC
SEQ ID NO: 15	P232VRv: AATTAACCG AC ACATTCATACTGATTTCCGTAATAACCAGAAGA

En negrita se resalta el triplete sustituido. Las secuencias se muestran de 5' a 3'.

- Triptófano por Tirosina en la posición 47. Para hacer referencia a esta sustitución se puede usar el término W47Y.

- Asparragina por Serina en la posición 49. Para hacer referencia a esta sustitución se puede usar el término N49S.

- Lisina por Fenilalanina en la posición 181. Para hacer referencia a esta sustitución se puede usar el término K181F.

En el clonaje y amplificación de los productos de PCR se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α [(F'I EndA1, hsdR17 (rk-mk-) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Naf) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)] que fue crecida y transformada siguiendo la metodología estándar.

1.3. Clonaje de la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis* en pYES2.0

El gen codificante para la fructofuranosidasa de *S. occidentalis* incluido en el vector pstBlue1, que contiene Leucina, Serina o Glutámico en la posición 196 o que contiene Leucina en la posición 196 más Serina, Valina, Tirosina, Serina o Fenilalanina en las posiciones 52, 232, 47, 49 y 181, respectivamente, se obtuvo digiriendo con *Bam*HI y *Xba*I y se fusionó al vector bifuncional (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*) pYES2.0 (Invitrogen) previamente linearizado con estas mismas enzimas de restricción. Este plásmido incluye como marcador bacteriano el gen que confiere resistencia a ampicilina, el origen de replicación del plásmido de 2 μ m de levadura, el promotor de *S. cerevisiae* regulable por galactosa pGAL1 y *URA3* como marcador de selección.

La construcción obtenida en *E. coli*, SoINV-pYES2 Leu 196 (SoINV-Leu), Ser 196 (SoINV-Ser), o Glu 196 (SoINV-Glu) así como SoINV-Leu con las modificaciones N52S, P232V, W47Y, N49S o K181F, se verificaron por PCR y posterior secuenciación; se incluyeron en la cepa de *S. cerevisiae* EUROSCARF YIL162w [BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YIL162w::kanMX4] (*accession code* Y02321) utilizando la metodología estándar de transformación por acetato de litio. En ausencia del plásmido recombinante, esta cepa de *S. cerevisiae* es incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono por la delección del gen YIL162w. Se seleccionaron clones URA3, que fueron verificados por PCR utilizando oligonucleótidos dirigidos hacia el gen codificante de la fructofuranosidasa de *S. occidentalis* y análisis electroforéticos en geles de agarosa. Se comprobó la inclusión del gen seleccionado y su funcionalidad por crecimiento positivo de los clones seleccionados en placas de medio mínimo utilizando sacarosa como única fuente de carbono SC(U)Suc (YNB: Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO al 0.7% (p/v), sacarosa 2%, 50 μ g/ml His y Met y 100 μ g/ml Leu. Agar 3%) y Antimicina A (2 μ g/ml) como agente bloqueante de la posible utilización de los aminoácidos como fuente de carbono.

1.4. Expresión del gen codificante para la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis* en *S. cerevisiae*

La producción de actividad fructofuranosidasa se analizó en cultivos de *S. cerevisiae* que incluían la construcción SoINV-Leu, SoINV-Glu ó SoINV-Ser, así como SoINV-Leu con las modificaciones N52S, P232V, W47Y, N49S o K181F, crecidos en medio mínimo glucosa para levaduras SC(U)D (YNB: Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO al 0.7% (p/v), glucosa 2%, 50 μ g/ml His y Met y 100 μ g/ml Leu). Los cultivos se realizaron en matraces de vidrio incubados a una temperatura comprendida entre 28-30°C y una agitación orbital constante de 100-250 rpm. Las condiciones óptimas para el crecimiento fueron 30°C y 200 rpm.

ES 2 359 545 A1

Estos cultivos fueron empleados para inocular los medios utilizados para la expresión del gen bajo el control del promotor pGAL1, inoculados en todos los casos a 0,4 UDO 660 nm y utilizando el medio mínimo de inducción SC(U) G (YNB: *Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids*, DIFCO al 0.7% (p/v), galactosa 2%, 50 µg/ml His y Met y 100 µg/ml Leu), o el medio rico YPGal (extracto de levadura 1%, galactosa 2%, bactopectona 1%).

Se fueron obteniendo muestras de los cultivos a distintos tiempos, se centrifugaron y fueron separadas la fracción extracelular, Sn, y la fracción celular, C, que es tratada con el agente Yeast Buster (Novagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se valoró la actividad fructofuranosidasa tanto en la fracción celular (C) como en la libre de células (Sn).

Se ensayó la actividad fructofuranosidasa valorando la liberación de glucosa sobre sacarosa al 5%. Se usó un ensayo colorimétrico y la metodología estándar. La glucosa liberada se cuantificó utilizando la reacción acoplada de la glucosa oxidasa-peroxidasa: 0.4 ml de la solución a valorar se mezcló con 0.1 ml de solución A:B (20:1) (A: 0.85 U/ml glucosa oxidasa, 0.40 U/ml peroxidasa en tampón fosfato sódico pH 5; B: O-Dianisidina 0.6%). Se incubó 30 minutos a 37°C y cuantificó espectrofotométricamente a 450 nm. Se utilizó una curva patrón de glucosa (1 a 100 µg/ml). La unidad de actividad fructofuranosidasa se define en µg glucosa valorada/ml de enzima y min de reacción en las condiciones descritas.

La tabla 4 muestra los niveles de actividad fructofuranosidasa asociada a la fracción celular y extracelular de *S. cerevisiae* que expresa las construcciones mencionadas anteriormente.

TABLA 4

Unidades de actividad fructofuranosidasa valorada en las fracciones extracelular (Sn) y celular (c) de S. cerevisiae SoINV-Leu y SoINV-Ser. Se muestra el valor máximo de actividad producido en cultivos crecidos durante 12-20 h en medio rico YPGal

Construcción	Actividad (U)	
	Fracción celular (c)	Fracción extracelular (sn)
SoINV-Leu	0,95	0,47
SoINV-Ser	8,59	11,59

No se valoró actividad fructofuranosidasa en el medio extracelular ni en la fracción asociada a células cuando se empleó la cepa de *S. cerevisiae* SoINV-Glu.

En la Fig. 2 se muestra la evolución de la actividad fructofuranosidasa valorada en el medio de cultivo del organismo que expresan SoINV-Leu crecido en medio rico YPGal. En los organismos crecidos en medio mínimo SC(U) G se observó menor actividad fructofuranosidasa que en los crecidos en medio rico YPGal; se obtuvieron valores de actividad que oscilaron entre el 30-40% de los obtenidos en el medio rico tanto para la fracción celular (c) como para la extracelular (sn). Se obtuvo aproximadamente 25 veces más actividad extracelular con la construcción SoINV-Ser que en la SoINV-Leu.

Ejemplo 2

Caracterización enzimática de la enzima de S. occidentalis expresada en S. cerevisiae y medida de su actividad transferasa

2.1. Caracterización enzimática de la enzima de *S. occidentalis* expresada en *S. cerevisiae*

A tenor de que en la fracción extracelular hay siempre un menor contenido de proteínas totales que en el celular, para la purificación de las enzimas expresadas en *S. cerevisiae* se partió de 1000 ml de fracción extracelular de los microorganismos. Se utilizó el siguiente método:

1º) Concentración de la fracción extracelular utilizando un sistema de filtración tangencial (filtro de 30 kDa) seguida de diálisis frente a HCl-Tris 20 mM pH 7 (tampón A) durante 2,5 horas a una temperatura de 22°C (Fracción-1, F-1).

ES 2 359 545 A1

2º) Cromatografía de intercambio iónico a pH 7.0. Se aplicaron 50 ml de la muestra a una columna de 20 ml de intercambio iónico de DEAE-Sephacel equilibrada con tampón A. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente de NaCl de 0 a 0,5 M. La fracción eluida a 0.1 M de sal presentaba la actividad fructofuranosidasa, ésta se dializó frente a tampón A, y concentro mediante filtros Amicon 10 kDa (Fracción-2; F-2).

5

La purificación fue valorada analizando las proteínas presentes tras cada uno de los pasos de la purificación en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

La actividad fructofuranosidasa de la enzima purificada se ensayó utilizando sacarosa como sustrato siguiendo el procedimiento previamente descrito.

10

2.2. Actividad transferasa de la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis* SoINV-Leu o SoINV-Ser expresada en *S. cerevisiae*

Se ensayó la actividad de transglicosilación de la proteína urificada (F-2) de las cepas de *S. cerevisiae* que portan la construcción SoINV-Leu y SoINV-Ser crecidas en medio rico YPGal. Se prepararon reacciones utilizando una alta concentración de sacarosa (1M=342 g/l), para favorecer la formación de enlaces glicosídicos en detrimento de la reacción de hidrólisis, y una actividad enzimática final en la mezcla de reacción de aproximadamente 0,3 U. La Fig 3 muestra el cromatograma de la mezcla de reacción a las 6 horas obtenido con la construcción SoINV-Ser. La enzima presenta actividad de hidrólisis y de transferencia. Se forman fructosa (pico 1) y glucosa (pico 2) como productos hidrolíticos, y dos trisacáridos: uno mayoritario (pico 5), identificado como 6-kestosa [β -D-Fru-(2→6)- β -D-Fru-(2→1)- α -D-Glu] y otro minoritario (pico 4), identificado como 1-kestosa [β -D-Fru-(2→1)- β -D-Fru-(2→1)- α -D-Glu]. La sacarosa no hidrolizada se corresponde con el pico 3.

En la tabla 5 se muestra la composición (en g/l) de los carbohidratos presentes en la mezcla de reacción a lo largo de 72 horas de incubación a 50°C. La relación molar 6-kestosa/1-kestosa alcanza un valor máximo de 6.9 a las 4 horas de reacción para SoINV-Ser. En el punto de máxima producción de FOS (6 horas), se obtuvieron 25,48 g/l de FOS, lo que corresponde a un porcentaje del 8,72% de FOS respecto al total de carbohidratos en la mezcla de reacción para una conversión de sacarosa del 47%. Utilizando la enzima nativa expresada en *S. occidentalis* y las mismas condiciones de ensayo se obtuvieron 21,55 g/l de FOS, lo que representa un 6,21% de FOS respecto al total de carbohidratos en la mezcla para una conversión de sacarosa del 62,9%.

35

TABLA 5

Composición de la mezcla de reacción con el tiempo tras la incubación a 50°C de sacarosa con el concentrado enzimático, F-2, de SoINV-Ser. Condiciones de reacción: 342 g sacarosa/l en 0.1 M acetato sódico (pH 5.6), 150 rpm. El ensayo se realizó con 0,3 U de biocatalizador. Análisis mediante HPLC utilizando una bomba Waters delta 500, columna Lichrospher 100-NH2 (Merck) de 250 x 4.6 mm, acetonitrilo:agua 75:25 v/v, 0.7 ml/min, 25°C, detector de evaporativo de dispersión de luz (light-scattering). Nombre de los compuestos: 1, fructosa; 2, glucosa; 3, sacarosa [α -D-Glu-(1→2)- β -D-Fru]; 4, 1-kestosa [β -D-Fru-(2→1)- β -D-Fru-(2→1)- α -D-Glu]; 5, 6-kestosa [β -D-Fru-(2→6)- β -D-Fru-(2→1)- α -D-Glu]

45

Tiempo de reacción (h)	Composición de la mezcla de reacción (gramos/litro)					Porcentaje (p/p) de FOS ^a
	1	2	3	4	5	
0	0,00	0,00	342,00	0,00	0,00	0
6	71,8	61,36	178,97	3,66	25,48	8,72
12	80,77	132,93	106,85	3,53	16,66	6,27
24	128,57	187,54	21,94	1,42	2,12	1,16
48	149,72	192,28	0,00	0,00	0,00	0
72	153,48	188,52	0,00	0,00	0,00	0

65

^a Porcentaje de fructo-oligosacáridos referido al peso total de azúcares.

ES 2 359 545 A1

La enzima SoINV-Ser, que tiene la misma secuencia aminoacídica que la proteína de partida, expresada en el organismo heterólogo se comporta de una forma bastante similar a como lo hace la enzima nativa expresada en *S. occidentalis*.

Se ensayó la actividad de transglicosilación de la enzima SoINV-Leu. Se preparó una reacción utilizando, como anteriormente, una concentración de sacarosa de 342 g/l y una actividad enzimática final en la mezcla de reacción de aproximadamente 0.3 U. La Fig. 4 muestra el cromatograma de la mezcla de reacción a las 72 horas. El perfil de los productos generados es muy similar al obtenido con SoINV-Ser pero la relación 6-kestosa/1-kestosa es de aproximadamente 60 y el nivel de fructooligosacáridos producido es mayor al obtenido previamente, ya sea utilizando la enzima nativa expresada en *S. occidentalis* o en *S. cerevisiae* (SoINV-Ser).

En la tabla 6 se muestra la composición (en g/l) de los carbohidratos presentes en la mezcla de reacción a lo largo de 120 horas de incubación a 45°C. La relación molar 6-kestosa/1-kestosa es aproximadamente 60 en el punto de máxima producción de FOS (72 horas de reacción), aquí se obtuvieron 66,85 g/l de FOS, lo que corresponde a un porcentaje del 20,57% de FOS respecto al total de carbohidratos en la mezcla para una conversión de sacarosa del 48,2%. Transcurridas 120 horas de reacción, se siguen obteniendo 63,99 g/l de FOS. El porcentaje total (p/p) de fructooligosacáridos fue del 19,81%, valor referido al peso total de carbohidratos en el medio.

TABLA 6

Composición de la mezcla de reacción con el tiempo tras la incubación a 45°C de sacarosa con el concentrado enzimático, F2, de SoINV-Leu. Condiciones de reacción: 342 g sacarosa/l en 0.1 M acetato sódico (pH 5.6), 150 rpm. El ensayo se realizó con 0,3 U/ml de biocatalizador. Análisis mediante HPLC utilizando una bomba Waters delta 500, columna Lichrospher 100-NH2 (Merck) de 250 x 4.6 mm, acetonitrilo:agua 75:25 v/v, 0.7 ml/min, 25°C, detector de evaporativo de dispersión de luz (light-scattering). Nombre de los compuestos: 1, fructosa; 2, glucosa; 3, sacarosa [α -D-Glu-(1→2)- β -D-Fru]; 4, 1-kestosa [β -D-Fru-(2→1)- β -D-Fru-(2→1)- α -D-Glu]; 5, 6-kestosa [β -D-Fru-(2→6)- β -D-Fru-(2→1)- α -D-Glu]

Tiempo de reacción (h)	Composición de la mezcla de reacción (gramos/litro)					Porcentaje (p/p) de FOS ^a
	1	2	3	4	5	
0	0,00	0,00	342,00	0,00	0,00	0
6	3,13	12,84	326,04	0,00	0,00	0
12	6,61	24,86	271,34	0,14	39,00	11,45
24	13,78	45,11	221,00	0,40	60,25	18,16
48	15,69	57,73	204,63	0,65	60,70	18,69
72	23,90	70,58	177,15	1,12	65,73	20,57
96	23,72	69,53	179,22	1,09	65,69	20,33
120	25,24	72,31	176,68	0,95	63,04	19,81

La Fig 5 muestra la comparación del porcentaje de FOS totales producidos por las distintas enzimas evaluadas en este apartado con respecto al tiempo de reacción.

La Fig 6 muestra el nivel de FOS producido por los organismos utilizados. La nueva enzima que contiene Leucina en la posición 196 produce aproximadamente 2.5 veces más 6-kestosa que la proteína nativa que contiene Serina en esta posición.

2.3. Actividad transferasa de la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis* SoINV-Leu que incluye Serina en la posición 52 (N52S) o Valina en la posición 232 (P232V) expresada en *S. cerevisiae*

Utilizando una metodología similar a la anteriormente descrita se sustituyeron distintos residuos aminoacídicos de la proteína SoINV-Leu y se valoró la actividad transferasa de las proteínas obtenidas. Las sustituciones Asparragina por Serina de la posición 52 y Prolina por Valina de la 232 dieron lugar a nuevas proteínas con una actividad transferasa mejorada, se obtuvieron niveles máximos de producción de 6-kestosa unas 6 veces superiores a los obtenidos con la proteína de partida expresada en *S. occidentalis*.

La tabla 7 y la Fig 7 muestran los resultados de producción obtenidos con estas nuevas enzimas y la enzima de partida (SoI).

ES 2 359 545 A1

TABLA 7

Producción máxima de FOS y de 6-kestosa (% y g/l) obtenido por la enzima nativa (SoI), y las expresadas en S. cerevisiae que incluyen Serina en la posición 196 (196S), Leu en esta posición (196L) y 196L más Serina en la posición 52 (N52S) o Valina en la posición 232 (P232V). Las reacciones se siguieron durante 155 h y se utilizaron las condiciones de ensayo y análisis que se indican en la Tabla 5

	SoI	196S	196L	N52S	P232V
%FOS	6,22	8,72	20,57	27,35	24,36
FOS g/l	21,27	29,14	66,85	93,53	83,31
6-kestosa g/l	13,82	16,66	65,69	90,54	80,99
%6-kestosa	65	67,48	93,37	96,79	97,21

En negrita se resaltan los resultados más significativos.

2.4. Actividad transferasa de la Fructofuranosidasa de S. occidentalis SoINV-Leu que incluye las sustituciones N49S y K181F para la producción de FOS

Se crecieron las cepas de S. cerevisiae que portan el gen codificante para la fructofuranosidasa SoINV-Leu196 que incluye las sustituciones en la posición 49 Asparragina por Serina y en la 181 Lisina por Fenilalanina. Se utilizó medio rico YPGal y la metodología descrita en apartados anteriores de la presente invención. La actividad enzimática se purificó y se valoró tal como se ha descrito en otros apartados. Se utilizó como sustrato sacarosa a 342 g/l. El ensayo se llevó a cabo a 45°C con agitación de 200 rpm durante 155 h. Se recogieron fracciones a distintos tiempos de la reacción y los productos generados se analizaron mediante HPLC tal y como se ha descrito anteriormente. En el máximo de producción de FOS se obtuvo 26,18 g/l y 0,42 g/l de 6-kestosa y 1-kestosa para la enzima que incluye la sustitución N49S, y 39,5 g/l y 0,77 g/l de 6-kestosa y 1-kestosa para la que porta la sustitución K181F. Por tanto las sustituciones del residuo 47 Triptófano por Tirosina (W47Y), del residuo 49 Asparragina por Serina (N49S) y del residuo 181 Lisina por Fenilalanina (K181F) dieron lugar a nuevas enzimas con una actividad transferasa disminuida.

A continuación se especifican los detalles de algunos de los métodos o procedimientos necesarios para obtener los resultados descritos en la presente invención.

Producción de fructofuranosidasa mediante cultivos de S. occidentalis crecido en medios de cultivo empleando Inulina como fuente de carbono

Para la producción de la enzima de S. occidentalis se empleo un medio basado en inulina. Previamente se creció la levadura en 50 ml de medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2% y glucosa 2%) durante 16 horas. Se utilizaron matraces de vidrio de 250 ml incubados a 200 rpm y 29°C. Todo el volumen se transfirió a 1 L de medio basado en inulina (2% peptona, 2% inulina) y se creció durante 72 horas en las mismas condiciones descritas. Se recogieron fracciones cada 6 horas y se separaron las células (C) del sobrenadante (Sn) por centrifugación. Se determinó la actividad fructofuranosidasa como se describe anteriormente. Se obtuvo un máximo de actividad enzimática en el medio extracelular del organismo de 15 a 20 U a las 48 horas de cultivo.

Uso de la enzima producida en S. occidentalis utilizando medios que comprenden inulina para la producción de FOS

El producto liberado y valorado en el apartado correspondiente de la presente invención fue empleado para la producción de FOS utilizando como sustrato sacarosa a 342 g/l en tampón Acetato sódico 100 mM pH 5,2. El ensayo se realizó a 45°C y una agitación de 200 rpm durante 72 h. Se recogieron fracciones a distintos tiempos de la reacción y los productos generados se analizaron mediante HPLC tal y como se describió anteriormente. El máximo de producción de FOS se obtuvo a las 12 h de reacción llegando a producirse unos 21,25 g/l; la hidrólisis de sacarosa fue prácticamente total tras 48 h de reacción.

Producción de fructofuranosidasa mediante un cultivo de S. cerevisiae SoINV-Leu crecido en medio mínimo

La cepa de S. cerevisiae SoInv-Leu se creció en medio mínimo SC(U)Gal (YNB: Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO al 0.7% (p/v), galactosa 2%, 50 µg/ml His y Met y 100 ug/ml Leu) con agitación de 250 rpm durante 48 h. Se alcanzó un máximo de crecimiento de 2,4 unidades a D0660 nm, que coincide prácticamente con el máximo de actividad fructofuranosidasa valorada en tanto en la fracción celular (0,4 U) como en la extracelular (0,15 U).

ES 2 359 545 A1

Producción de fructofuranosidasa en cultivos de distintos clones de S. cerevisiae SoINV-Leu crecidos en medio rico

5 Se valoró la actividad fructofuranosidasa asociada a la fracción celular y extracelular de distintos clones de *S. cerevisiae* SoInv-Leu crecidos en medio rico. Los cultivos se precrecieron en medio mínimo SC(U)D hasta saturación, posteriormente las células se pasaron a medio rico, YPGal (1% Yeast Extract, 1% Peptona y 2% Galactosa) hasta obtener una densidad óptica inicial de 0,4 unidades a D0660 nm. Se analizó la actividad fructofuranosidasa de las fracciones asociadas a las células (C) y del medio extracelular (Sn) según se ha descrito anteriormente. Se obtuvieron valores máximos de actividad asociados a la fracción celular y extracelular comprendidos entre 0,95-0,45 U y 0,47-0,37 U, respectivamente, para los distintos clones analizados.

Sustitución de los tripletes de la secuencia original del gen de la fructofuranosidasa (secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1) mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

15 Para la sustitución de la posición 196 (al igual que el resto de posiciones descritas en la presente invención) de la proteína nativa se utilizó PCR, y como ADN molde el gen codificante para la fructofuranosidasa de *S. occidentalis* incluido en el vector pstBlue1 obtenido tal y como se describe en el apartado correspondiente. Cada reacción incluía: 5U (1 μ l) de High Fidelity Plus TM (Roche), 10 μ l del tampón para esta enzima 5 x, 1 μ l de dNTs 40 mM, 1 μ l del ADN descrito, 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos cebadores y H₂O hasta un volumen final de 50 μ l. Esta mezcla de reacción se incubó: a) 3 minutos a 94°C, b) 20 ciclos de 94°C 1 minuto, 55°C 30 segundos y 72°C 7,5 minutos, y c) 1 ciclo de 72°C 5 minutos. El producto se analizó en gel de agarosa. El producto resultado de la amplificación se incubó con la enzima de restricción *DpnI* durante 1-2 horas en la siguiente mezcla de reacción: 40 μ l del producto de la amplificación, 4 μ l de H₂O y 5 μ l de solución tampon Tango 10x junto con 1 μ l (10U) de la enzima. El resultado de la reacción se empleó para transformar *E. coli*, seleccionando en placas de LB con ampicilina y comprobando la sustitución del triplete CTG por TCA (o del los tripletes correspondientes a las sustituciones deseadas) por secuenciación utilizando la metodología estándar (SIDI, UAM).

Obtención de la fracción proteica asociada a células (C) empleando el reactivo comercial Yeast Buster (Novagen)

30 Con independencia del medio de crecimiento utilizado, para valorar la actividad fructofuranosidasa asociada a la fracción celular, la fracción extracelular se retiró por centrifugación (5 min a 5000 x g) y posterior decantación. El precipitado celular se pesó e incubó con el reactivo comercial *Yeast Buster* en una proporción 1:5 (p:v) utilizando agitación constante durante 20 minutos y 20°C. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 5000 x g. La fracción soluble obtenida, libre de precipitado, se utilizó directamente para la determinación de actividad fructofuranosidasa siguiendo la metodología anteriormente descrita.

40

45

50

55

60

65

ES 2 359 545 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica derivada de SEQ ID NO: 1 de *Schwanniomyces occidentalis*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232.
- 10 2. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 2.
- 10 3. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 2, donde dicha secuencia nucleotídica, que codifica para SEQ ID NO: 2, es SEQ ID NO: 3.
- 15 4. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 4.
- 15 5. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 4, donde dicha secuencia nucleotídica, que codifica para SEQ ID NO: 4, es SEQ ID NO: 5.
- 20 6. Vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 7. Producto de expresión de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o del vector de expresión según la reivindicación 6.
- 25 8. Célula que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el vector de expresión según la reivindicación 6, el producto de expresión según la reivindicación 7, o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 9. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión.
- 30 10. Uso del vector de expresión según la reivindicación 6, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión.
- 35 11. Uso de la célula según la reivindicación 7, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión.
- 35 12. Uso del producto de expresión según la reivindicación 8, para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa mediante un sistema heterólogo de expresión.
- 40 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde el sistema heterólogo expresa dicha secuencia nucleotídica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- 45 14. Método para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa que comprende:
 - 45 a) modificar la secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1 de tal forma que se obtenga una secuencia nucleotídica que codifique para una secuencia aminoacídica que presente la sustitución del aminoácido Asparragina por el aminoácido Serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido Prolina por el aminoácido valina en la posición 232,
 - 50 b) insertar al menos una secuencia nucleotídica obtenida en el paso (a) en un vector de expresión capaz de expresar dicha secuencia nucleotídica en un microorganismo que pertenece a una especie diferente de *Schwanniomyces occidentalis*,
 - 55 c) transformar el producto obtenido en el paso (b) al menos en una célula de dicho microorganismo, y
 - 55 d) cultivar la célula obtenida en el paso (c) en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las levaduras transformadas o del sistema heterólogo seleccionado.
- 60 15. Método según la reivindicación 14, donde además comprende:
 - 60 e) recuperar el producto enzimático con actividad fructofuranosidasa del medio de cultivo y/o de las células del microorganismo.
- 65 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 2.

ES 2 359 545 A1

17. Método según la reivindicación 16, donde dicha secuencia nucleotídica, que codifica para SEQ ID NO: 2, es SEQ ID NO: 3.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 4.

19. Método según la reivindicación 14, donde dicha secuencia nucleotídica, que codifica para SEQ ID NO: 4, es SEQ ID NO: 5.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, donde el microorganismo que pertenece a una especie diferente de *Schwanniomyces occidentalis* es *Saccharomyces cerevisiae*.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, donde el cultivo de la célula según el paso (c) se lleva a cabo a una temperatura de entre 28 y 30°C.

22. Producto enzimático con actividad fructofuranosidasa obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21.

23. Producto enzimático según la reivindicación 22, donde dicho producto tiene actividad transfructosidasa en presencia de uno o varios sustratos glucídicos.

24. Producto enzimático según la reivindicación 23, donde los productos resultantes de la actividad transfructosidasa son fructooligosacáridos.

25. Producto enzimático según la reivindicación 24, donde los fructooligosacáridos tienen enlaces β -1,2, y β -2,6.

26. Producto enzimático según la reivindicación 25, donde los productos son 6-kestosa y 1-kestosa.

27. Método para la obtención de oligosacáridos que comprende:

a) poner en contacto, *in vitro*, el producto enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26 con al menos un sustrato glucídico, e

b) incubar la mezcla descrita en el paso (a).

28. Método para la obtención de oligosacáridos según la reivindicación 27, que además comprende:

c) recuperar los oligosacáridos obtenidos tras la incubación descrita en el paso (b).

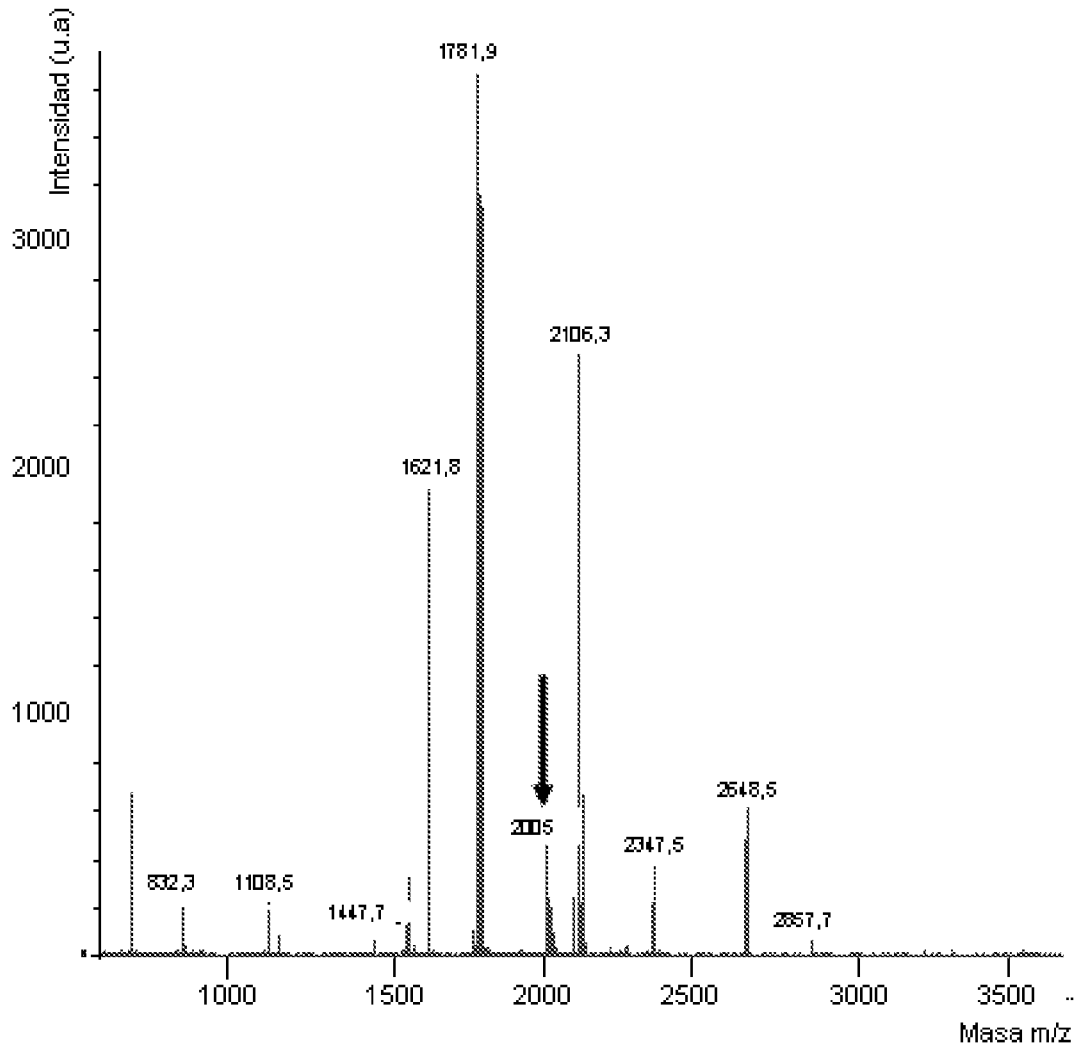


FIG. 1

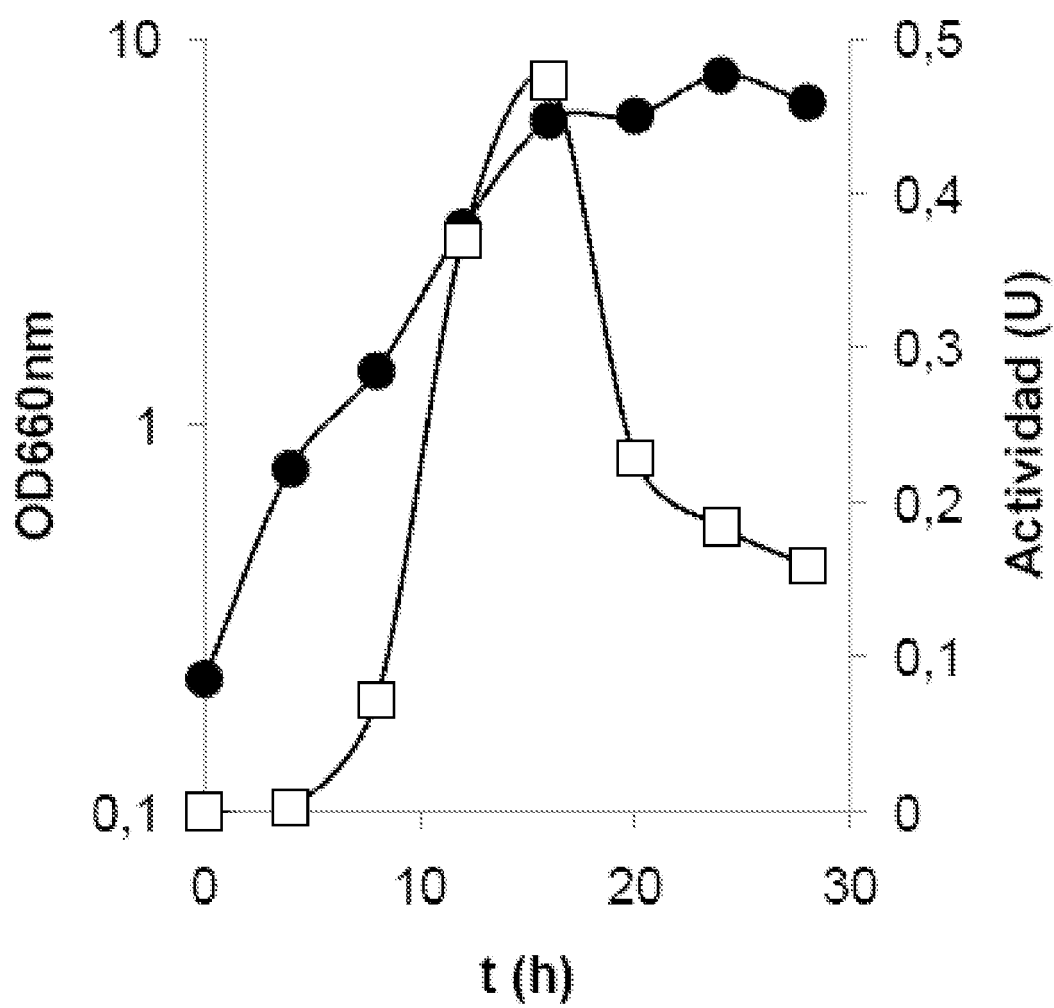


FIG. 2

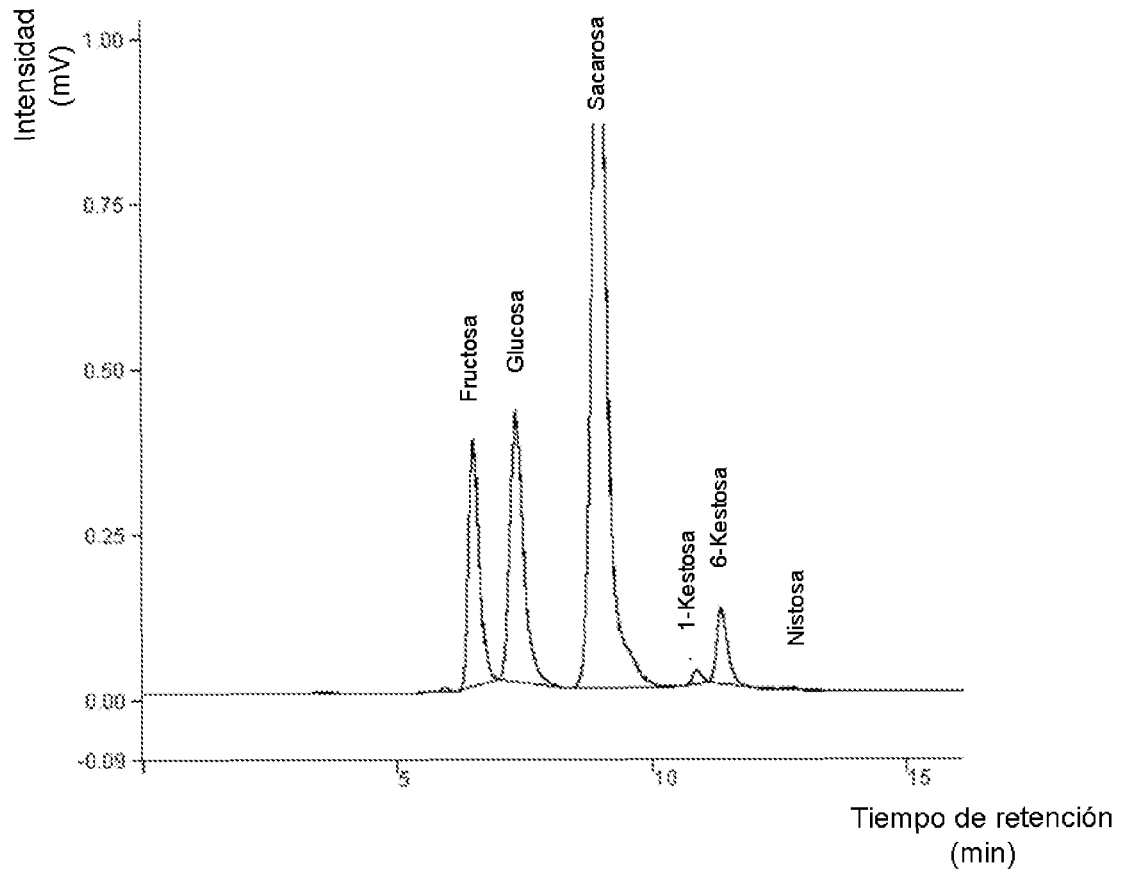


FIG. 3

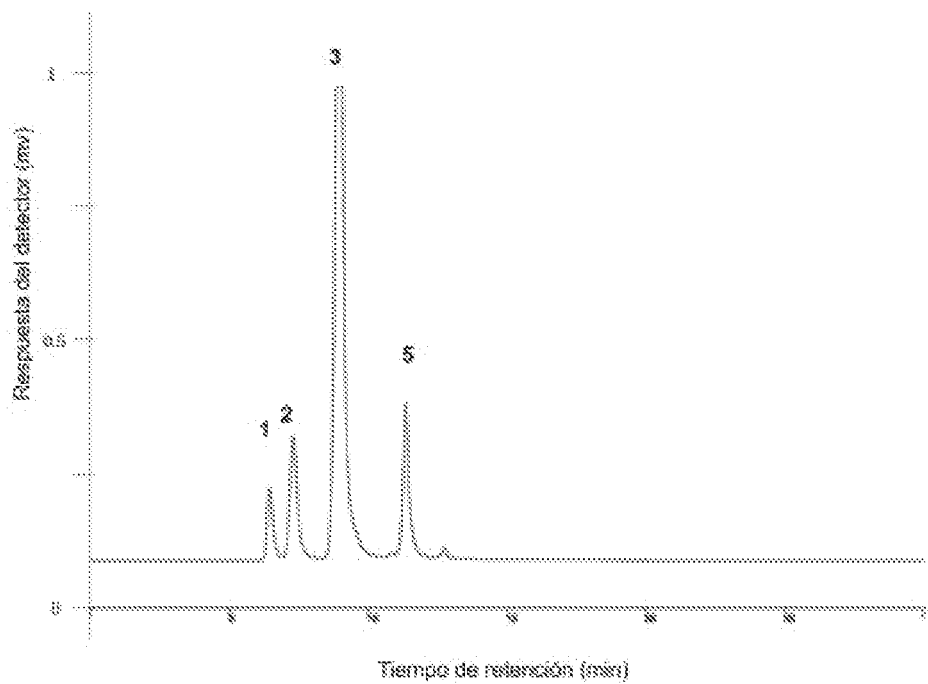


FIG. 4

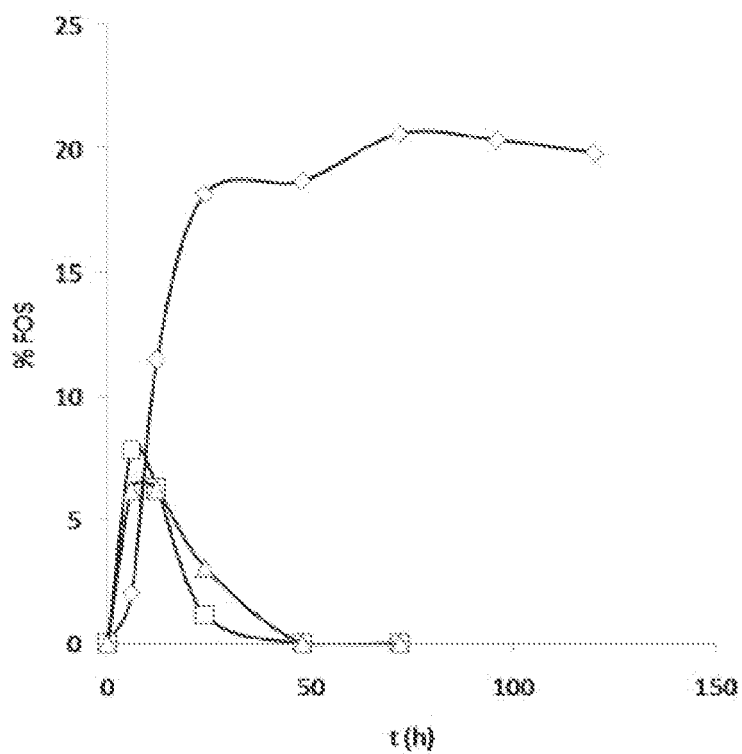


FIG. 5

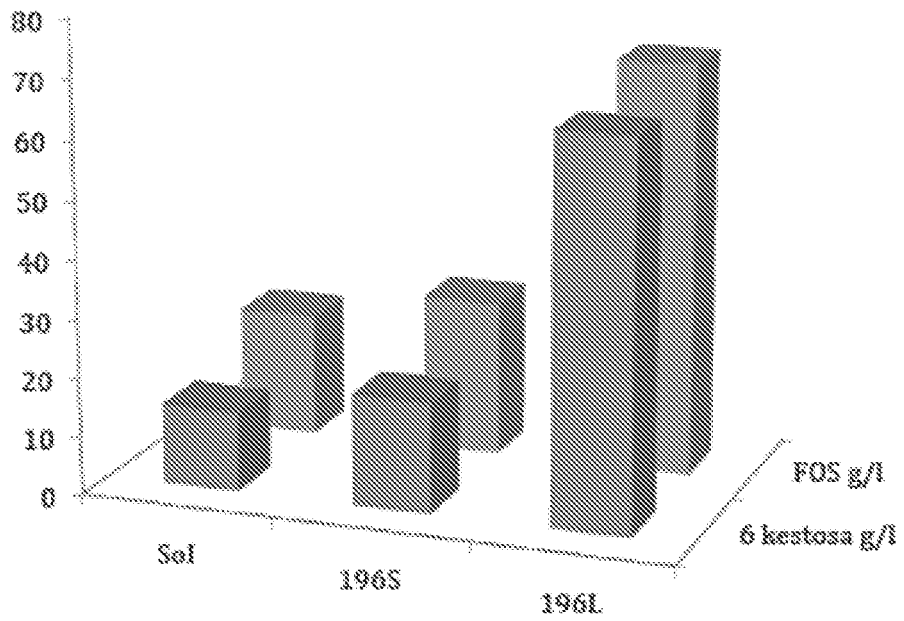


FIG. 6

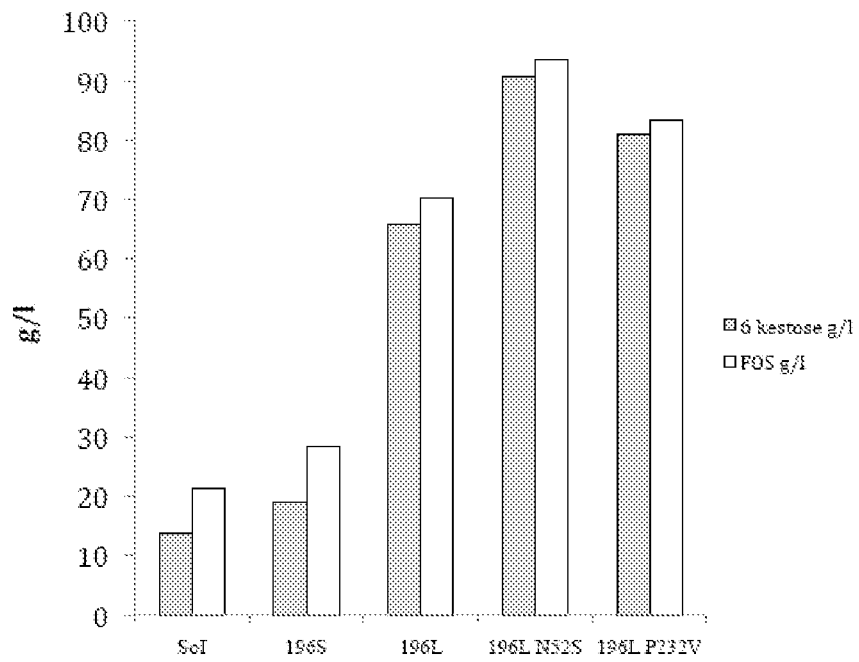


FIG. 7

ES 2 359 545 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid

5 <120> Fructofuranosidasa mejorada genéticamente para la obtención del prebiótico 6-kestosa

<130> ES1595.27

10 <160> 15

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 535

<212> PRT

<213> *Schwanniomyces occidentalis*

20 <400> 1

25 Met Val Gln Val Leu Ser Val Leu Val Ile Pro Leu Leu Thr Leu Phe
1 5 10 15

Phe Gly Tyr Val Ala Ser Ser Ser Ile Asp Leu Ser Val Asp Thr Ser
20 25 30

30 Glu Tyr Asn Arg Pro Leu Ile His Phe Thr Pro Glu Lys Gly Trp Met
35 40 45

35 Asn Asp Pro Asn Gly Leu Phe Tyr Asp Lys Thr Ala Lys Leu Trp His
50 55 60

40 Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn Ala Thr Ala Trp Gly Gln Pro Leu
65 70 75 80

Tyr Trp Gly His Ala Thr Ser Asn Asp Leu Val His Trp Asp Glu His
85 90 95

45 Glu Ile Ala Ile Gly Pro Glu His Asp Asn Glu Gly Ile Phe Ser Gly
100 105 110

50 Ser Ile Val Val Asp His Asn Asn Thr Ser Gly Phe Phe Asn Ser Ser
115 120 125

Ile Asp Pro Asn Gln Arg Ile Val Ala Ile Tyr Thr Asn Asn Ile Pro
130 135 140

55 Asp Leu Gln Thr Gln Asp Ile Ala Phe Ser Leu Asp Gly Gly Tyr Thr
145 150 155 160

60 Phe Thr Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Val Ile Asp Val Ser Ser Asn Gln
165 170 175

Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp His Glu Asp Ser Asn Gln Trp Ile
180 185 190

65 Met Val Val Leu Lys Ser Gln Glu Tyr Lys Ile Gln Ile Phe Gly Ser

ES 2 359 545 A1

	195		200		205												
5	Ala	Asn 210	Leu	Lys	Asn	Trp	Val 215	Leu	Asn	Ser	Asn	Phe 220	Ser	Ser	Gly	Tyr	
10	Tyr 225	Gly	Asn	Gln	Tyr	Glu 230	Cys	Pro	Gly	Leu	Ile 235	Glu	Val	Pro	Ile	Glu 240	
15	Asn	Ser	Asp	Lys	Ser 245	Lys	Trp	Val	Met	Phe 250	Leu	Ala	Ile	Asn	Pro 255	Gly	
20	Ser	Pro	Leu	Gly 260	Gly	Ser	Ile	Asn	Gln 265	Tyr	Phe	Val	Gly	Asp 270	Phe	Asp	
25	Gly	Phe	Gln 275	Phe	Val	Pro	Asp	Asp 280	Ser	Gln	Thr	Arg	Phe 285	Val	Asp	Ile	
30	Gly	Lys 290	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe 295	Gln	Thr	Phe	Ser	Glu 300	Val	Glu	His	Gly	
35	Val 305	Leu	Gly	Leu	Ala	Trp 310	Ala	Ser	Asn	Trp	Gln 315	Tyr	Ala	Asp	Gln	Val 320	
40	Pro	Thr	Asn	Pro	Trp 325	Arg	Ser	Ser	Thr	Ser 330	Leu	Ala	Arg	Asn	Tyr 335	Thr	
45	Leu	Arg	Tyr	Val 340	His	Thr	Asn	Ala	Glu 345	Thr	Lys	Gln	Leu	Thr 350	Leu	Ile	
50	Gln	Asn	Pro 355	Val	Leu	Pro	Asp	Ser 360	Ile	Asn	Val	Val	Asp 365	Lys	Leu	Lys	
55	Lys	Lys 370	Asn	Val	Lys	Leu	Thr 375	Asn	Lys	Lys	Pro	Ile 380	Lys	Thr	Asn	Phe	
60	Lys 385	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu 390	Phe	Asp	Phe	Asn	Ile 395	Thr	Phe	Lys	Val	Leu 400	
65	Asn	Leu	Asn	Val	Ser 405	Pro	Gly	Lys	Thr	His 410	Phe	Asp	Ile	Leu	Ile 415	Asn	
70	Ser	Gln	Glu	Leu 420	Asn	Ser	Ser	Val	Asp 425	Ser	Ile	Lys	Ile	Gly 430	Phe	Asp	
75	Ser	Ser	Gln 435	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile 440	Asp	Arg	His	Ile	Pro 445	Asn	Val	Glu	
80	Phe	Pro 450	Arg	Lys	Gln	Phe	Phe 455	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala 460	Ala	Tyr	Leu	Glu	
85	Pro 465	Leu	Asp	Tyr	Asp	Gln 470	Asp	Leu	Arg	Val	Phe 475	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ile 480	

ES 2 359 545 A1

5 Phe Thr Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Val Ile Asp Val Ser Ser Asn Gln
 165 170 175
 Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp His Glu Asp Ser Asn Gln Trp Ile
 180 185 190
 10 Met Val Val Leu Lys Ser Gln Glu Tyr Lys Ile Gln Ile Phe Gly Ser
 195 200 205
 Ala Asn Leu Lys Asn Trp Val Leu Asn Ser Asn Phe Ser Ser Gly Tyr
 210 215 220
 Tyr Gly Asn Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Leu Ile Glu Val Pro Ile Glu
 225 230 235 240
 20 Asn Ser Asp Lys Ser Lys Trp Val Met Phe Leu Ala Ile Asn Pro Gly
 245 250 255
 Ser Pro Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln Tyr Phe Val Gly Asp Phe Asp
 260 265 270
 30 Gly Phe Gln Phe Val Pro Asp Asp Ser Gln Thr Arg Phe Val Asp Ile
 275 280 285
 Gly Lys Asp Phe Tyr Ala Phe Gln Thr Phe Ser Glu Val Glu His Gly
 290 295 300
 35 Val Leu Gly Leu Ala Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr Ala Asp Gln Val
 305 310 315 320
 40 Pro Thr Asn Pro Trp Arg Ser Ser Thr Ser Leu Ala Arg Asn Tyr Thr
 325 330 335
 45 Leu Arg Tyr Val His Thr Asn Ala Glu Thr Lys Gln Leu Thr Leu Ile
 340 345 350
 Gln Asn Pro Val Leu Pro Asp Ser Ile Asn Val Val Asp Lys Leu Lys
 355 360 365
 50 Lys Lys Asn Val Lys Leu Thr Asn Lys Lys Pro Ile Lys Thr Asn Phe
 370 375 380
 55 Lys Gly Ser Thr Gly Leu Phe Asp Phe Asn Ile Thr Phe Lys Val Leu
 385 390 395 400
 60 Asn Leu Asn Val Ser Pro Gly Lys Thr His Phe Asp Ile Leu Ile Asn
 405 410 415
 Ser Gln Glu Leu Asn Ser Ser Val Asp Ser Ile Lys Ile Gly Phe Asp
 420 425 430 435
 65 Ser Ser Gln Ser Ser Phe Tyr Ile Asp Arg His Ile Pro Asn Val Glu

ES 2 359 545 A1

	435		440		445											
5	Phe	Pro	Arg	Lys	Gln	Phe	Phe	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu
	450					455						460				
	Pro	Leu	Asp	Tyr	Asp	Gln	Asp	Leu	Arg	Val	Phe	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ile
	465					470					475					480
10	Val	Asp	Lys	Asn	Ile	Ile	Glu	Leu	Tyr	Phe	Asn	Asp	Gly	Thr	Val	Ala
					485					490					495	
15	Met	Thr	Asn	Thr	Phe	Phe	Met	Gly	Glu	Gly	Lys	Tyr	Pro	His	Asp	Ile
				500					505					510		
	Gln	Ile	Val	Thr	Asp	Thr	Glu	Glu	Pro	Leu	Phe	Glu	Leu	Glu	Ser	Val
			515					520					525			
20	Ile	Ile	Arg	Glu	Leu	Asn	Lys									
	530						535									

<210> 3

<211> 1608

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 2.

<400> 3

35	atggtacaag	ttttaagtgt	attagtgatt	cctttgctaa	ccctatTTTT	tgggtatgtg	60
	gcttcgtcct	cgattgactt	atcggtagat	acgtcagagt	ataaccggcc	attaattcat	120
40	tttactccgg	aaaaaggatg	gatgaatgat	ccgagtggtc	tattctacga	taaaactgct	180
	aagctttggc	acttatactt	ccagtataat	ccaaatgcta	ctgcgtgggg	gcaaccatta	240
	tattggggac	acgctacgtc	gaatgatttg	gtacattggg	atgaacatga	gatagctatt	300
45	ggacctgaac	acgataatga	aggatctttt	tcaggtagta	ttgtcgttga	ccataataat	360
	acctctgggt	tcttcaatag	ctcaattgat	ccaaaccaa	gaattggtgc	catttatacc	420
	aacaatatac	cagatttaca	aacccaagac	attgcatttt	cgttagatgg	aggatatact	480
50	tttactaaat	atgagaataa	tctgtgatt	gatgtctcct	caaaccaatt	ccgtgatcca	540
	aaagttttct	ggcatgaaga	ttcaaatcaa	tggatcatgg	ttgttctgaa	atcgcaagag	600
	tacaaaattc	aaatTTTTg	ttcagcaaat	ttgaagaact	gggttttgaa	ttcaaatttt	660
55	tcttctgggt	attacggaaa	tcagtatgaa	tgtccagggt	taattgaagt	tcctattgag	720
	aattcagaca	aatcaaagt	ggttatgttt	ttagcaatta	atccgggatc	gcctttgggt	780
	ggttcgatta	accaatattt	tgttgggtgat	tttgacggct	tccagtttgt	tccagatgat	840
60	tctcaaacta	gatttgttga	tattggaaaa	gacttttatg	catttcaaac	gttcagtgag	900
	gttgaacatg	gagtcttagg	tttagcttgg	gcatcaaatt	ggcagtatgc	tgaccagggt	960
65	ccgacaaatc	catggagaag	ttcaacgtcg	ttagcaagaa	attacacctt	aagatatgtc	1020

ES 2 359 545 A1

```

catacaaatg ctgaaactaa acagctaaca ttgattcaaa atccagtttt accagattct      1080
atcaatgttg tagataaatt gaaaaagaaa aatgtcaaac ttaccaataa gaagccaatt      1140
5  aaaacaaatt tcaagggttc aacgggatta tttgatttta atattacatt taaagtatta      1200
aacttgaatg tgtctcctgg aaaaactcat tttgacattt taattaattc tcaagagttg      1260
aattcatcag ttgattccat taaaattggt tttgattcat cccagtcatc gttttatatac      1320
10 gatcgtcata ttccaaatgt tgaatttccc cgtaagcaat tctttactga taagttggct      1380
gcataccttg aacctttaga ctacgatcaa gacttaaggg tttttagttt gtatggatt      1440
15 gttgacaaga atataattga gttgtatttt aatgacggaa cagttgctat gactaacaca      1500
ttcttcatgg gtgaaggtaa gtatccacac gatatacaaa ttgtgaccga tactgaagag      1560
ccattatttg agtttagagtc tgttatcatt agagaactaa ataagtag      1608

```

<210> 4

<211> 535

<212> PRT

25 <213> Artificial Sequence

<220>

30 <223> Secuencia SEQ ID NO: 1 que presenta la sustitución del aminoácido prolina por el aminoácido valina en la posición 232.

<400> 4

```

35 Met Val Gln Val Leu Ser Val Leu Val Ile Pro Leu Leu Thr Leu Phe
   1           5           10           15
Phe Gly Tyr Val Ala Ser Ser Ser Ile Asp Leu Ser Val Asp Thr Ser
40           20           25           30
Glu Tyr Asn Arg Pro Leu Ile His Phe Thr Pro Glu Lys Gly Trp Met
           35           40           45
45 Asn Asp Pro Asn Gly Leu Phe Tyr Asp Lys Thr Ala Lys Leu Trp His
           50           55           60
50 Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn Ala Thr Ala Trp Gly Gln Pro Leu
           65           70           75           80
Tyr Trp Gly His Ala Thr Ser Asn Asp Leu Val His Trp Asp Glu His
55           85           90           95
Glu Ile Ala Ile Gly Pro Glu His Asp Asn Glu Gly Ile Phe Ser Gly
           100           105           110
60 Ser Ile Val Val Asp His Asn Asn Thr Ser Gly Phe Phe Asn Ser Ser
           115           120           125
65 Ile Asp Pro Asn Gln Arg Ile Val Ala Ile Tyr Thr Asn Asn Ile Pro
           130           135           140

```

ES 2 359 545 A1

Asp Leu Gln Thr Gln Asp Ile Ala Phe Ser Leu Asp Gly Gly Tyr Thr
 145 150 155 160

5

Phe Thr Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Val Ile Asp Val Ser Ser Asn Gln
 165 170 175

10

Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp His Glu Asp Ser Asn Gln Trp Ile
 180 185 190

15

Met Val Val Leu Lys Ser Gln Glu Tyr Lys Ile Gln Ile Phe Gly Ser
 195 200 205

20

Ala Asn Leu Lys Asn Trp Val Leu Asn Ser Asn Phe Ser Ser Gly Tyr
 210 215 220

25

Tyr Gly Asn Gln Tyr Glu Cys Val Gly Leu Ile Glu Val Pro Ile Glu
 225 230 235 240

30

Asn Ser Asp Lys Ser Lys Trp Val Met Phe Leu Ala Ile Asn Pro Gly
 245 250 255

35

Ser Pro Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln Tyr Phe Val Gly Asp Phe Asp
 260 265 270

40

Gly Phe Gln Phe Val Pro Asp Asp Ser Gln Thr Arg Phe Val Asp Ile
 275 280 285

45

Gly Lys Asp Phe Tyr Ala Phe Gln Thr Phe Ser Glu Val Glu His Gly
 290 295 300

50

Val Leu Gly Leu Ala Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr Ala Asp Gln Val
 305 310 315 320

55

Pro Thr Asn Pro Trp Arg Ser Ser Thr Ser Leu Ala Arg Asn Tyr Thr
 325 330 335

60

Leu Arg Tyr Val His Thr Asn Ala Glu Thr Lys Gln Leu Thr Leu Ile
 340 345 350

65

Gln Asn Pro Val Leu Pro Asp Ser Ile Asn Val Val Asp Lys Leu Lys
 355 360 365

70

Lys Lys Asn Val Lys Leu Thr Asn Lys Lys Pro Ile Lys Thr Asn Phe
 370 375 380

75

Lys Gly Ser Thr Gly Leu Phe Asp Phe Asn Ile Thr Phe Lys Val Leu
 385 390 395 400

80

Asn Leu Asn Val Ser Pro Gly Lys Thr His Phe Asp Ile Leu Ile Asn
 405 410 415

85

Ser Gln Glu Leu Asn Ser Ser Val Asp Ser Ile Lys Ile Gly Phe Asp

ES 2 359 545 A1

		420						425					430			
5	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Asp	Arg	His	Ile	Pro	Asn	Val	Glu
			435					440					445			
	Phe	Pro	Arg	Lys	Gln	Phe	Phe	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu
		450					455					460				
10	Pro	Leu	Asp	Tyr	Asp	Gln	Asp	Leu	Arg	Val	Phe	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ile
	465					470					475					480
	Val	Asp	Lys	Asn	Ile	Ile	Glu	Leu	Tyr	Phe	Asn	Asp	Gly	Thr	Val	Ala
15					485					490					495	
	Met	Thr	Asn	Thr	Phe	Phe	Met	Gly	Glu	Gly	Lys	Tyr	Pro	His	Asp	Ile
				500					505					510		
20	Gln	Ile	Val	Thr	Asp	Thr	Glu	Glu	Pro	Leu	Phe	Glu	Leu	Glu	Ser	Val
			515					520					525			
	Ile	Ile	Arg	Glu	Leu	Asn	Lys									
25		530					535									

<210> 5

<211> 1608

<212> DNA

30 <213> Artificial Sequence

<220>

35 <223> Secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 4.

<400> 5

40	atggtacaag	ttttaagtgt	attagtgatt	cctttgctaa	ccctatTTTT	tgggtatgtg	60
	gcttcgtcct	cgattgactt	atcggtagat	acgtcagagt	ataaccggcc	attaattcat	120
	tttactccgg	aaaaaggatg	gatgaatgat	ccgaatggtc	tattctacga	taaaactgct	180
45	aagctttggc	acttatactt	ccagtataat	ccaaatgcta	ctgcgtgggg	gcaaccatta	240
	tattggggac	acgctacgtc	gaatgatttg	gtacattggg	atgaacatga	gatagctatt	300
	ggacctgaac	acgataatga	aggatatctt	tcaggtagta	ttgtcgttga	ccataataat	360
50	acctctggtt	tcttcaatag	ctcaattgat	ccaaaccaa	gaattgttgc	catttatacc	420
	aacaatatac	cagatttaca	aaccgaagac	attgcatttt	cgttagatgg	aggatatact	480
55	tttactaaat	atgagaataa	tctgtgatt	gatgtctcct	caaaccaatt	ccgtgatcca	540
	aaagttttct	ggcatgaaga	ttcaaatcaa	tggatcatgg	ttgttctgaa	atcgcaagag	600
	tacaaaattc	aaatttttgg	ttcagcaaat	ttgaagaact	gggttttgaa	ttcaattttt	660
60	tcttctggtt	attacggaaa	tcagtatgaa	tgtgtcggtt	taattgaagt	tcctattgag	720
	aattcagaca	aatcaaagtg	ggttatgttt	ttagcaatta	atccgggatc	gcctttgggt	780
	ggttcgatta	accaatattt	tgttgggtgat	tttgacggct	tccagtttgt	tccagatgat	840
65	tctcaaacta	gatttgttga	tattggaaaa	gacttttatg	catttcaaac	gttcagttag	900

ES 2 359 545 A1

gttgaacatg gagtcttagg tttagcttgg gcatcaaatt ggcagtatgc tgaccagggt 960
 ccgacaaatc catggagaag ttcaacgtcg ttagcaagaa attacacctt aagatatgtc 1020
 5 catacaaatg ctgaaactaa acagctaaca ttgattcaaa atccagtttt accagattct 1080
 atcaatgttg tagataaatt gaaaaagaaa aatgtcaaac ttaccaataa gaagccaatt 1140
 aaaacaaatt tcaagggttc aacgggatta tttgatttta atattacatt taaagtatta 1200
 10 aacttgaatg tgtctcctgg aaaaactcat tttgacattt taattaattc tcaagagttg 1260
 aattcatcag ttgattccat taaaattgggt tttgattcat cccagtcatc gttttatatc 1320
 15 gatcgtcata ttccaaatgt tgaatttccc cgtaagcaat tctttactga taagttggct 1380
 gcataccttg aacctttaga ctacgatcaa gacttaaggg tttttagttt gtatggtatt 1440
 gttgacaaga atataattga gttgtatttt aatgacggaa cagttgctat gactaacaca 1500
 20 ttcttcatgg gtgaaggtaa gtatccacac gatatacaaa ttgtgaccga tactgaagag 1560
 ccattatttg agttagagtc tgttatcatt agagaactaa ataagtag 1608

25 <210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> Cebador con la secuencia reconocida por la enzima de restricción BamHI

35 <400> 6

taggatccaa catggtacaa gttttaagtg tattag 36

40 <210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 45 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Cebador con la secuencia reconocida por la enzima de restricción XbaI

50 <400> 7

tatcttcatc aatagactat ctagacttat ttagttcct 40

55 <210> 8
 <211> 41
 <212> DNA
 60 <213> Artificial Sequence

<220>
 65 <223> Oligonucleótido directo empleado en la sustitución del triplete CTG por TCA del gen codificante para la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis*.

ES 2 359 545 A1

<400> 8

gttgtttcaa aatcgcaaga gtacaaaatt caaatTTTTg g 41

5

<210> 9

<211> 43

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Oligonucleótido reverso empleado en la sustitución del triplete CTG por TCA del gen codificante para la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis*.

<400> 9

20 **cgatTTTgaa acaaccatga tccattgatt tgaatcttca tgc** 43

<210> 10

25 <211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Oligonucleótido directo empleado en la sustitución del triplete CTG por GAA del gen codificante para la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis*.

35 <400> 10

gttgTTgaaa aatcgcaaga gtacaaaatt caaatTTTTg g 41

40 <210> 11

<211> 43

<212> DNA

45 <213> Artificial Sequence

<220>

50 <223> Oligonucleótido reverso empleado en la sustitución del triplete CTG por GAA del gen codificante para la Fructofuranosidasa de *S. occidentalis*.

<400> 11

cgatTTTTca acaaccatga tccattgatt tgaatcttca tgc 43

55

<210> 12

<211> 45

<212> DNA

60 <213> Artificial Sequence

<220>

65 <223> Oligonucleótido directo empleado en la sustitución del triplete que codifica para el aminoácido de la posición 52 por el triplete AGT que codifica para el aminoácido serina del gen que codifica para la fructofuranosidasa de *S. occidentalis*.

ES 2 359 545 A1

	<400> 12		
		gaatgatccg agtgggtctat tctacgataa aactgctaag ctttg	45
5			
	<210> 13		
	<211> 47		
10	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
15	<223> Oligonucleótido reverso empleado en la sustitución del triplete que codifica para el aminoácido de la posición 52 por el triplete AGT que codifica para el aminoácido serina del gen que codifica para la fructofuranosidasa de <i>S. occidentalis</i> .		
	<400> 13		
20		gaatagacca ctcggatcat tcatccatcc ttttccggag taaatac	47
25	<210> 14		
	<211> 45		
	<212> DNA		
30	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido directo empleado en la sustitución del triplete que codifica para el aminoácido de la posición 232 por el triplete GTC que codifica para el aminoácido valina del gen que codifica para la fructofuranosidasa de <i>S. occidentalis</i> .		
	<400> 14		
40		tatgaatgtg tcggtttaat tgaagttcct attgagaatt cagac	45
	<210> 15		
45	<211> 45		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
50	<220>		
	<223> Oligonucleótido reverso empleado en la sustitución del triplete que codifica para el aminoácido de la posición 232 por el triplete GTC que codifica para el aminoácido valina del gen que codifica para la fructofuranosidasa de <i>S. occidentalis</i> .		
55	<400> 15		
		aattaaaccg acacattcat actgatttcc gtaataacca gaaga	45
60			
65			



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930929

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.10.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/24** (01.01.2006)
C12N15/56 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007074187 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 05.07.2007, página 22.	1-8
A	ALVARO-BENITO M. et al. Characterization of a β -fructofuranosidase from <i>Schwanniomyces occidentalis</i> with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. 2007. <i>Journal of Biotechnology</i> . Vol. 132 (1), páginas 75-81.	1-28
A	KLEIN R.D. Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase from the yeast <i>Schwanniomyces occidentalis</i> . 1989. <i>Current Genetics</i> . Vol.16, páginas 145-152.	1-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.02.2011

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-28	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 9-28	SI
	Reivindicaciones 1-8	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007074187 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS), página 22.	05.07.2007
D02	ALVARO-BENITO M. et al. Characterization of a β -fructofuranosidase from <i>Schwanniomyces occidentalis</i> with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. <i>Journal of Biotechnology</i> . Vol. 132 (1), páginas 75-81.	2007
D03	KLEIN R.D. Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase from the yeast <i>Schwanniomyces occidentalis</i> . <i>Current Genetics</i> . Vol.16, páginas 145-152.	1989

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga una fructofuranosidasa para la obtención del oligosacárido prebiótico 6-kestosa.

El documento D01 muestra un procedimiento para la obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa así como el producto obtenido por el citado procedimiento.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

En las reivindicaciones 1-8 de la solicitud de patente se reivindica una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoácídica que deriva de la secuencia SEQ ID NO:1 de *S. occidentalis*, donde dicha secuencia aminoácídica presenta la sustitución del aminoácido asparragina por el aminoácido serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido prolina por el aminoácido valina en la posición 232. También se reivindican una célula y un vector de expresión que comprende dicha secuencia así como su producto de expresión.

En el documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, se divulga (en la reivindicación 24 de la página 22 y en la SEQ ID NO:1 de la lista de secuencias) la secuencia aminoácídica SEQ ID NO:1 de *S. occidentalis*.

Las diferencias entre la secuencia reivindicada en la solicitud de patente y la secuencia que divulga el documento D01 residen en que en la secuencia reivindicada en la solicitud de patente se ha realizado la sustitución del aminoácido asparragina por el aminoácido serina en la posición 52 y/o la sustitución del aminoácido prolina por el aminoácido valina en la posición 232. La realización de dichas modificaciones en la SEQ ID NO:1, divulgada en el documento D01, no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia. Por tanto, las reivindicaciones 1-8 presentan novedad pero no actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.