

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 154**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)
C07H 3/04 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **95923598 .7**
96 Fecha de presentación: **07.07.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **0774007**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.1997**

54 Título: **PRODUCCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS.**

30 Prioridad:
08.07.1994 NL 9401140
05.04.1995 NL 1000064

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2012

73 Titular/es:
**STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK IN
NEDERLAND (SON)**
131 LAAN VAN NIEUW OOST INDIE
2595 BM DEN HAAG, NL

72 Inventor/es:
SMEEKENS, Josephus, Christianus, Maria;
EBSKAMP, Micha-l, Johannes, Marcus;
GEERTS, Hendrikus, Adrianus, Maria y
WEISBEEK, Petrus, Jacobus

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 154 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

Producción de oligosacáridos en plantas transgénicas.

La presente invención se refiere a un método para producir oligosacáridos, a los oligosacáridos producidos de esta manera, a plantas transgénicas y a células vegetales capaces de producir oligosacáridos y a las aplicaciones de los oligosacáridos obtenidos de esta manera.

En la industria alimentaria se puede observar una tendencia creciente hacia lo "light" y lo bajo en calorías. En este sentido, se evita el uso de demasiada grasa y/o azúcar en los productos. Sin embargo, para poder proporcionar productos alimenticios con un sabor dulce se dispone comercialmente de un número creciente de sustitutos del azúcar. El aspartame es un ejemplo conocido de los mismos. El aspartame, sin embargo, tiene malas propiedades organolépticas.

Otro tipo de sustituto de azúcar está formado por oligosacáridos. Los oligosacáridos son moléculas que consisten en dos o más monosacáridos tales como fructosa y/o glucosa. Los monosacáridos de dichos oligosacáridos están unidos unos a otros mediante enlaces β -(2-1)- ó β -(2-6). El número de monosacáridos en un oligosacárido se indica mediante el valor de grado de polimerización DP (del inglés "Degree of Polymerisation"). Un valor DP de 3 indica que el oligosacárido está constituido por tres monosacáridos. Las oligofruktosas son oligosacáridos que constan totalmente de unidades de fructosa. Cuando un oligosacárido comprende también una o más unidades de glucosa, éstas estarán unidas mediante un enlace α -(1-2) a una unidad de fructosa. La composición de los oligosacáridos también se designa a través de la fórmula G_mF_n , en donde G representa glucosa y F fructosa y en donde m es igual a 0 ó 1 y n es un número entero mayor o igual a 0. Los oligosacáridos particularmente adecuados son aquellos en los que m es igual a 1 y n es de 2 a 8, preferiblemente 2 ó 3.

Los oligosacáridos difícilmente se hidrolizan en el estómago humano y en el intestino delgado, o no se hidrolizan en absoluto. De la oligofruktosa se sabe que las enzimas digestivas humanas no tienen efecto sobre el enlace β (2-1) y β (2-6) de la molécula. Por tanto, pasan a través del estómago y del intestino delgado sin ser degradadas y absorbidas por el organismo. Sin embargo, los oligosacáridos no abandonan el cuerpo, sino que son metabolizados por la flora microbiana del intestino grueso. En este punto, además de gas, se liberan ácidos grasos volátiles que a su vez sirven como fuente de energía para la flora intestinal. Este fenómeno explica porqué los oligosacáridos tienen un valor energético para humanos menor que los azúcares libres tales como la glucosa, la fructosa y la sacarosa, que son absorbidas por el organismo. No obstante, los oligosacáridos presentan un poder edulcorante suficiente para servir como sustitutos de los azúcares.

También se sabe que los oligosacáridos, particularmente la oligofruktosa, tiene un efecto bifidogénico, es decir, estimulan el crecimiento de Bifidobacterias en el sistema digestivo. Las bifidobacterias protegen frente al desarrollo de bacterias patogénicas y por tanto tienen una influencia positiva sobre la salud. Adicionalmente, los oligosacáridos son fibras nutricionales.

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente diferentes oligosacáridos, que se preparan de formas diversas.

Los oligosacáridos pueden prepararse mediante hidrólisis enzimática parcial de cadenas de inulina vegetal de mayor longitud. Por ejemplo, se describe un método para ello en la solicitud de patente Europea 440.074.

Los oligosacáridos también pueden sintetizarse enzimáticamente. Para esta ruta de producción enzimática se hace uso de enzimas, fructosiltransferasas, que convierten la sacarosa en una mezcla de oligosacáridos, y que son aisladas a partir de diferentes microorganismos (JP-80/40193).

Sin embargo, las rutas de producción conocidas tienen una serie de desventajas. En primer lugar, los métodos de producción conocidos son relativamente caros. Además de los oligosacáridos deseados, con una longitud de cadena de entre 2 y aproximadamente 7, en la mezcla producida también aparece un número comparativamente grande de azúcares libres y oligosacáridos con una longitud de cadena superior. La desventaja de muchos azúcares libres es que dan como resultado un aumento del valor energético de la mezcla. Los azúcares libres presentan, por ejemplo, un contenido energético de 17 kilojulios por gramo, mientras que el GF_2 y el GF_3 presentan un contenido energético de 4 a 6 kilojulios por gramo. Además, los azúcares libres provocan deterioro dental (caries).

Inversamente, los oligosacáridos con una longitud de cadena demasiado grande presentan una capacidad edulcorante demasiado baja, lo que provoca que la capacidad edulcorante media de la mezcla disminuya.

Al contrario que otros edulcorantes, tal como por ejemplo Aspartame, los oligosacáridos presentan buenas propiedades organolépticas.

El documento WO94/14970 describe un método para obtener plantas transgénicas que muestren una estructura de fructano modificada mediante la transformación con genes de fructosiltransferasa bacterianos.

El documento WO91/13076 describe un método in vitro para la producción enzimática de mezclas de oligosacáridos.

El objeto de la presente invención es proporcionar una ruta alternativa de producción de oligosacáridos con la que se eviten las anteriores desventajas.

Para dicho fin, la invención proporciona un método para producir una mezcla de oligosacáridos que tengan una longitud de cadena de moléculas individuales que sustancialmente se encuentre entre 2 y 8, que comprenda las etapas de:

a) seleccionar un gen de origen vegetal que codifique para una enzima capaz de convertir sacarosa en un oligosacárido;

b) unir el gen a señales adecuadas de transcripción-iniciación y transcripción-terminación con el objetivo de proporcionar una construcción de expresión;

c) transformar una célula vegetal adecuada con la construcción de expresión;

d) regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada;

e) cultivar la planta transgénica en las condiciones que permitan la expresión y la actividad de la enzima; y

f) aislar los oligosacáridos de la planta transgénica,

en donde el gen de las etapas a y b codifica para sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT) que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 4.

Por lo tanto, la invención proporciona un método con el cual, mediante el uso de plantas transgénicas o de células vegetales, se puede producir una mezcla de oligosacáridos que tengan más propiedades deseadas en comparación con los oligosacáridos preparados mediante procesos industriales conocidos.

La ventaja particular del método de acuerdo con la invención es que la distribución de longitudes de cadena es más estrecha, con lo cual en el producto final hay poco o ningún azúcar. La consecuencia de esto es una menor cariogenicidad y el deseado menor valor energético. También hay menos oligosacáridos con una longitud de cadena superior a 5 unidades. La ventaja de esto es que los oligosacáridos producidos de acuerdo con la invención presentan una mayor capacidad edulcorante específica. Se da que la capacidad edulcorante depende de la "longitud de cadena media". Cuanto mayor es la longitud de cadena media de una mezcla, menor es la capacidad edulcorante. La ventaja de una capacidad edulcorante específica elevada es que raramente es necesario añadir edulcorantes adicionales durante el procesamiento del producto.

Con respecto a la solubilidad se aplica una consideración similar. También se da en este caso que cuando la longitud de cadena media aumenta, la solubilidad disminuye. Las mezclas de acuerdo con la invención tienen, por tanto, una mayor solubilidad que las mezclas obtenidas mediante síntesis enzimática o hidrólisis enzimática. Además, los costes de producción se reducen considerablemente.

Existen indicios de que las cadenas cortas pueden ser absorbidas mejor en el cuerpo de bacterias de *Bifidus* que las largas. Las mezclas de oligosacáridos producidas mediante el método de acuerdo con la invención tendrán, por tanto, un mayor efecto bifidogénico.

El gen es el sacarosa-fructano-6-fructosiltransferasa (6-SFT) de cebada (*Hordeum vulgare L.*). Se proporcionan plantas transgénicas que expresan el 6-SFT para la producción de oligosacáridos.

Para la expresión en plantas del gen de fructosiltransferasa seleccionado, se pueden añadir al gen señales de transcripción-iniciación tales como promotores, potenciadores y otros similares, para obtener la construcción de expresión deseada. Dichos promotores de expresión pueden ser específicos de un tipo celular especial o pueden ser activos en una amplia diversidad de tipos celulares. Adicionalmente, el tiempo y el sitio de expresión se pueden determinar mediante el uso de, por ejemplo, promotores específicos del desarrollo. Un promotor usado generalmente para la expresión génica en plantas es el Promotor de Virus de Mosaico de Coliflor 35S (promotor CaMV), que es activo en muchos tipos celulares de la planta, dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta. Cuando el gen de fructosiltransferasa procede de una planta, también es posible usar sus propias secuencias reguladoras.

El promotor preferido puede ser un promotor específico de tejido o un promotor constitutivo, fuerte o débil, dependiendo de la planta diana y del propósito. Los ejemplos de promotores adecuados son el promotor de patatina específico de "sink" y el promotor de sintasa de almidón de gránulo ligado de la patata, o el promotor de esporamina de la batata.

Para aumentar aún más los niveles de transcripción, el promotor puede modificarse y contener una duplicación potenciadora.

La traducción de los ARNm's se puede mejorar añadiendo un potenciador de la traducción, tal como la señal

potenciadora de la traducción de ARN4 de Virus de Mosaico de la Alfalfa, que debe estar presente en la región 5' transcrita no traducida.

Para corregir la terminación de la transcripción se puede añadir un terminador a las construcciones. Un ejemplo de este tipo de secuencias es la secuencia de terminación del gen de nopalina sintasa.

5 La elección de las señales de expresión adecuadas para la situación específica se encuentra, por supuesto, al alcance del especialista medio en la técnica sin necesidad de aplicar trabajo inventivo adicional para tal fin.

La sacarosa, el sustrato de las fructosiltransferasas, es un carbohidrato presente en localizaciones muy dispares. Se sintetiza en el citoplasma y también se pueden encontrar cantidades significativas en el citosol, las vacuolas y el espacio extracelular (el apoplasto) o en otras posibles localizaciones.

10 Puesto que los procesos bioquímicos en las células vegetales a menudo están también limitados a uno o varios compartimentos celulares, es deseable provocar que la acumulación de los productos de los genes nuevos introducidos tenga lugar en un compartimento específico. Para este propósito, en la construcción de expresión puede haber presentes secuencias dirigidas que sean específicas de compartimentos celulares, que estén próximas a la parte codificadora de los genes de fructosiltransferasa que son expresados en las plantas transgénicas. Las regiones de aminoácidos específicas para apuntar a diferentes localizaciones celulares ya han sido identificadas y analizadas. Estas secuencias de ADN pueden estar ligadas a los genes de fructosiltransferasa de tal modo que la actividad enzimática está dirigida a un compartimento deseado de la célula o de la planta.

20 En una realización preferida de la invención, por tanto, la construcción de expresión también comprende una secuencia dirigida para dirigir la actividad de fructosiltransferasa a uno o más compartimentos específicos de la célula vegetal. Los ejemplos de secuencias dirigidas son la secuencia señal y la secuencia dirigida vacuolar del gen de carboxipeptidasa Y (cpy), la de la patatina procedente de la patata o la de la esporamina procedente de la batata, o la secuencia señal y la secuencia dirigida apoplástica del gen S de proteína relacionada con la patogénesis (pr-s). Sin embargo, éstos son solo ejemplos y el especialista en la técnica será capaz por sí mismo de seleccionar otras secuencias dirigidas.

25 La construcción de expresión puede, en principio, modificarse de tal modo que la acción dirigida tenga lugar en cualquier compartimento celular aleatorio, tal como la vacuola, los plástidos, la pared celular, el citoplasma, etc.

30 A menudo, es ventajoso para la planta controlar no solo la localización sino también el tiempo de expresión de los genes introducidos. Por ejemplo, normalmente es deseable limitar la expresión de las nuevas actividades enzimáticas introducidas a partes específicas de la planta, por ejemplo a los órganos cosechables, tales como tubérculos, frutos o semillas. Además, a menudo es deseable iniciar la expresión en estos órganos en una etapa concreta de desarrollo. Este es claramente el caso cuando la expresión de los genes introducidos interfiere con el desarrollo normal de dichos órganos.

35 Los oligosacáridos pueden usarse como sustituto de azúcar, jarabe de glucosa e isoglucosa en versiones "light" de diferentes productos alimenticios. Los ejemplos de productos alimenticios son confituras, galletas, pasteles, productos lácteos, comida para bebés, helados y otros postres, chocolate y similares. La estimulación de Bifidobacterias también es importante para la salud de animales. Por tanto, los oligosacáridos también pueden aplicarse, por ejemplo, en piensos animales.

La presente invención quedará más clara en base a los ejemplos mostrados más adelante. Se hace referencia en los ejemplos a las figuras anexas, que muestran lo siguiente:

40 La Figura 1 muestra la separación de 2 isoformas de la sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT) procedente de cebada después de la segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico en una columna Resource Q en un procedimiento de purificación. La Figura 1A muestra el perfil de elución de proteínas (A280) y la actividad de fructosiltransferasa de las fracciones obtenidas después de la cromatografía tras incubación con sacarosa 0,2 M en tampón (pH 5,75) de metil-piperazina (HCl) 25 mM. Los cromatogramas (Figura 1B) se obtuvieron mediante detección amperométrica de pulsos tras separación mediante HPLC de intercambio aniónico en una columna CarboPack-PA100. Los productos de reacción se obtuvieron después de incubar el conjunto I y el conjunto III solo con sacarosa, o con sacarosa e isoquestosa. Los carbohidratos fueron identificados mediante los tiempos de retención y se usó trehalosa como patrón interno.

50 Los círculos huecos de la Figura 1A representan la actividad de fructosiltransferasa, que se indica como la suma de la formación de questosa, bifurcosa, isoquestina y questina. En la Figura 1B, p corresponde a un producto no identificado que procede de contaminantes de la isoquestosa, y c de una contaminación del sustrato de isoquestosa.

55 La Figura 2A muestra un gráfico de la actividad enzimática de un conjunto de fracciones de 6-SFT (denominado conjunto II; véase la Figura 1) tras enfoque isoelectrico en condiciones no desnaturalizantes. Los triángulos rellenos indican la actividad de beta-fructosidasa medida como fructosa liberada, mientras que los círculos huecos indican la actividad de fructosiltransferasa medida como questosa formada. La Figura 2B es un gel de SDS-PAGE tras análisis

bi-dimensional del conjunto II después de la segunda cromatografía de intercambio aniónico. En este caso se muestran las dos isoformas de 6-SFT. Se observa que ambas isoformas constan de dos subunidades de 23 kDa y 49 kDa, respectivamente. La Figura 2C es la electroforesis de gel bi-dimensional de los IEF-marcadores ficocianina (pI 4,6), beta-lactoglobulina (pI 5,1) y bovino carbónico anhidrasa (pI 6,0).

5 La Figura 3 es una vista esquemática de la estrategia usada para obtener el clon de ADNc que codifica para 6-SFT procedente de cebada.

La Figura 4 muestra la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos de 6-SFT procedente de cebada derivada de la misma.

10 La Figura 5 es una vista general de la secuencia de aminoácidos deseada de 6-SFT de cebada, diferentes invertasas (beta-fructosidasas), levanasas y levansacarosas. La vista general se realizó mediante el programa Pileup del paquete de software de análisis de secuencias GCG. Se usaron las siguientes abreviaturas:

H.v. 6-SFT = sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa procedente de cebada.

V.r. Inv = invertasa de ácido soluble procedente de semilla de soja verde (mungbean; Arai y col., *Plant Cell Physiol.* 33, 245-252 (1992));

15 D.c. Inv = invertasa de ácido soluble de zanahoria (Unger y col., *Plant Physiol.* 104, 1351-1357 (1994));

L.e. Inv = invertasa de ácido soluble de tomate (Elliot y col., *Plant Mol. Biol.* 21, 515-524 (1993));

D.c. cw Inv = invertasa de pared celular de zanahoria (Sturm y Crispeels, *Plant Cell* 2, 1107-1119 (1990));

A.s. Inv = secuencia parcial de invertasa de avena (Wu y col., *J. Plant Physiol.* 142, 179-183 (1993));

E.c. Inv = invertasa (rafD) de *Escherichia coli* (Aslandis y col., *J. Bacteriol.* 171, 6753-6763 (1989));

20 S.m. Scrb = invertasa de *Streptococcus mutans* (Sato y Kuramitsu, *Infect. Immun.* 56, 1956-1960 (1989));

B.p. LelA = levanasa de *Bacillus polymyxa* (Bezzate y col., referencia no publicada de la base de datos de EMBO);

B.s. SacC = levanasa de *Bacillus subtilis* (Martin y col., *Mol. Gen. Genet.* 208, 177-184 (1987));

K.m. Inu = inulinasa de *Kluiveromyces marxianus* (Laloux y col., *FEBS Lett.* 289, 64-68 (1991));

25 S.c. Inv1 = invertasa 1 de levadura de horno (Hohmann y Gozalbo, *Mol. Gen. Genet.* 211, 446-454 (1988));

S.o. inv = invertasa de *Schwanniomyces occidentalis* (Klein y col., *Curr. Genet.* 16, 145-152 (1989));

A.n. Inv = invertasa de *Aspergillus niger* (Boddy y col., *Curr. Genet.* 24, 60-66 (1993));

B.a. SacB = levansacarasa de *Bacillus amyloquefaciens* (Tang y col., *Gene* 96, 89-93 (1990));

B.s. SacB = levansacarasa de *Bacillus subtilis* (Steinmetz y col., *Mol. Gen. Genet.* 200, 220-228 (1985));

30 S.m. SacB = levansacarasa de *Streptococcus mutans* (Shiroza y Kuramitsu, *J. Bacteriol.* 170, 810-816 (1988));

Z.m. LevU = levansacarasa de *Zymomonas mobilis* (Song y col., referencia no publicada de la base de datos EMBO).

35 La Figura 6 es un dendograma de 6-SFT de cebada con diferentes invertasas (beta-fructosidasas), levanasas y levansacarosas, basado en secuencias de aminoácidos derivadas. El dendograma se generó con las secuencias descritas en la Figura 5 haciendo uso del programa Pileup del paquete de software de análisis de secuencias GCG.

40 La Figura 7 muestra la expresión funcional de 6-SFT de cebada en protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*. Las barras de error indican la desviación estándar media. El ADNc de 6-SFT fue expresado durante 27 horas en protoplastos. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó la actividad de fructosiltransferasa en los extractos de protoplasto mediante incubación con sacarosa (Figura 7A) o sacarosa e isoquerosa (Figura 7B). Los círculos huecos muestran la actividad enzimática de extractos de protoplastos que fueron transformados con la construcción génica de 6-SFT. Los cuadrados huecos muestran la actividad de los extractos de protoplastos transformados con el vector sin el ADNc de 6-SFT.

45 La Figura 8 muestra los espectros de extractos obtenidos de plantas de tabaco transgénicas, que fueron obtenidos con un sistema Dionex DX-300 con una columna PA-100 y Detección Amperométrica de Pulsos, y elución con un gradiente de NaOH/NaAc de hasta 100% de NaOH. El número de la línea transgénica se indica por espectro, es decir 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11. C1 es la línea de control. El espectro de la línea 9 (NR 9 + ST) también se conoce en

combinación con una serie de inulina (G = glucosa, F = fructosa, S = sacarosa, DP = grado de polimerización).

La Figura 8 muestra los espectros de un control (C1), transformante nº 4 (#4) y transformante nº 4 en el que se añadió 100 ng de 6-questosa al extracto (#4 + 6K). La designación "6K" en el espectro indica el pico de 6-questosa.

Ejemplo 1

5 Sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT) de cebada

1. Introducción

La sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT) es una enzima clave para la biosíntesis de fructanos ramificados (también denominados graminanos) que son típicos de la hierba. La enzima forma questosa a partir de sacarosa y bifurcosa a partir de sacarosa e isoquestosa. En este ejemplo se describe la purificación de una 6-SFT de cebada (Hordeum vulgare L.), además de la clonación del ADNc completo y la confirmación de la funcionalidad.

2. Purificación de sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa

Se cortaron las hojas principales de plantas de cebada (Hordeum vulgare L. cv Express) de ocho a diez días de edad y se expusieron a luz de forma continua durante 48 horas para inducir la acumulación de fructanos y de las enzimas de la biosíntesis de fructano, tal como se describe en Simmen y col. Plant Physiol. 101, 459-468 (1993). A continuación las hojas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C hasta su uso.

Se preparó una preparación de enzima moliendo las hojas principales inducidas (700 g de peso bruto) hasta obtener un polvo fino en nitrógeno líquido, y posteriormente se suspendieron en tampón de extracción (metilpiperazina 25 mM, ajustado a un pH de 5,75 con HCl, con DTT 1 mM, benzamidina 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM y PVP al 0,5%). Para esto se usó 2 mL por gramo de peso bruto. Tras descongelar, el extracto se mantuvo a 4°C y se ajustó el pH a 4,75 añadiendo HCl 0,1 M en gotas mientras se agitaba. Tres horas después el extracto se centrifugó durante 30 minutos a 17.000 g. El sobrenadante resultante se sometió a diálisis durante una noche a 4°C frente a un tampón de diálisis (tampón de metilpiperazina (HCl) 10 mM (pH 5,75), con DTT 1 mM, benzamidina 1 mM, EDTA 1 mM y PMSF 0,1 mM).

La disolución enzimática se purificó mediante cromatografía de afinidad en Sefarosa Azul. Para este fin la disolución de enzimas se filtró a través de un filtro Millipore de 0,45 micrómetros y se cargó con un caudal de 2 mL por minuto en una columna (26x120mm) de Sefarosa Azul-6-flujo rápido (Pharmacia, Uppsala, Suecia), que se había equilibrado previamente con el tampón de diálisis descrito anteriormente. Con el objetivo de eliminar las proteínas sin afinidad por el colorante, la columna se lavó con tres volúmenes de lecho del tampón de diálisis. Las proteínas ligadas fueron eluidas con un caudal de 3 mL por minuto (fracciones de 5 mL), primero con NaCl 0,2 M en tampón de metilpiperazina (HCl) (pH 5,75) durante 30 minutos, seguido de un gradiente lineal de NaCl de 0,2 M a 0,5 M en el mismo tampón y en 90 minutos.

Todas las fracciones que contenían actividad de 6-SFT fueron agrupadas, dializadas durante una noche a 4°C frente a tampón de diálisis y a continuación concentradas hasta un tercio del volumen inicial mediante cubrición de la bolsa de diálisis con polietilenglicol 40.000 e incubación durante 4 horas a 4°C.

Para una primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico la fracción de 6-SFT se filtró y se cargó con un caudal de 3 mL por minuto en una columna Resource Q de 6 mL (Pharmacia), que había sido equilibrada antes con tampón de diálisis. Después de que la columna fuera lavada con tampón de metilpiperazina (HCl) 10 mM (pH 5,75), la proteína ligada se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,15 M de NaCl en el mismo tampón en 8 minutos con un caudal de 15 mL por minuto. Se tomaron fracciones de 1 mL. Las fracciones que contenían 6-SFT fueron agrupadas y suplementadas con sulfato amónico hasta una concentración final de 2 M.

El conjunto de 6-SFT fue sometido posteriormente a cromatografía de interacción hidrofóbica. Para este propósito, el conjunto se cargó con un caudal de 0,5 mL por minuto en una columna de alquilsuperosa HR5/5 (Pharmacia) que había sido equilibrada previamente con tampón de ácido cítrico-Na₂HPO₄ 50 mM (pH 5,0) con sulfato amónico 2 M. Las proteínas ligadas fueron eluidas en un tiempo de 60 minutos con un caudal de 0,5 mL por minuto con un gradiente lineal de 2 a 0 M de sulfato amónico en tampón de ácido cítrico-Na₂HPO₄ 50 mM (pH 5,0). Se tomaron fracciones de 0,5 mL y las fracciones que contenían actividad 6-SFT fueron agrupadas.

La fracción agrupada fue sometida a cromatografía de filtración de gel y antes de ello fue primeramente concentrada hasta un volumen total de 190 microlitros en tubos de centrifuga de microconcentrador (Centricon-30, Amicon-Grace, Beverly, CT). El concentrado se colocó en una columna de filtración de gel Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia), que se equilibró con tampón de ácido cítrico-Na₂HPO₄ 50 mM (pH 5,0) con NaCl 0,2 M, y se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 0,4 mL por minuto. Se tomaron fracciones de 0,2 mL y las fracciones que contenían actividad de 6-SFT se agruparon y se desalinizaron mediante 5 etapas sucesivas de concentración y dilución en tubos de centrifuga de microconcentrador Centricon-30 con tampón de metilpiperazina (HCl) 10 mM (pH 5,75).

Para una segunda etapa de cromatografía de intercambio aniónico, la muestra desalada se cargó en una columna

Resource Q de 6 mL (Pharmacia). Las condiciones y los tampones fueron los mismos que en la primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico pero se redujo el tamaño de la fracción hasta 0,5 mL. Las fracciones que contenían actividad de 6-SFT fueron combinadas en el conjunto I, II y III (figura 1A).

5 Durante la purificación, se determinó la actividad enzimática de las fracciones después de cada etapa de purificación. Para este propósito, porciones de 50-100 μ L de las preparaciones enzimáticas fueron desalinizadas haciéndolas pasar a través de columnas Biogel P-10 (8x300 mm) mediante centrifugación a 350 g durante 5 minutos (Simmen y col., ver anterior). Las preparaciones enzimáticas desalinizadas fueron incubadas con sacarosa 0,2 M en tampón de ácido cítrico- Na_2HPO_4 50 mM (pH 5,75) para identificar las fracciones que contenían actividad de 6-SFT durante la purificación. Las preparaciones enzimáticas finales (conjunto I y III) fueron incubadas solo con sacarosa 10 0,1 M o en combinación con isoquiestosa 0,1 M en tampón de metilpiperazina (HCl) 25 mM (pH 5,75). A menos que se indique lo contrario, los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo durante tres horas a 27°C. La reacción se detuvo calentando las muestras durante 3 minutos a 95°C. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 13.000 g, suplementadas con trehalosa (patrón interno) hasta una concentración final de 0,1 μ g/ μ L, y almacenadas a -20°C hasta ser analizadas.

15 Los carbohidratos neutros fueron analizados mediante cromatografía de intercambio aniónico en una columna CarboPac PA-100 (Dionex, Sunnyvale, USA) con un sistema de cromatografía de gradiente Dionex DX-300 acoplado a detección amperométrica de pulsos (Simmen y col., ver arriba). Antes de analizar mediante cromatografía de intercambio aniónico, se detectaron las actividades enzimáticas que producen glucosa a partir de sacarosa en las fracciones recogidas durante la purificación enzimática, esto usando el kit de ensayo de glucosa 20 (método GOD-Perid, Boehringer GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se aislaron dos isoformas de 6-SFT con propiedades catalíticas indistinguibles mediante la purificación (tabla I). Mediante cromatografía de afinidad en la columna azul HighTrap y mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en la columna de alquilsuperosa, se separó casi completamente la actividad de invertasa (beta-fructosidasa) de la 6-SFT. Esto significa que la 6-SFT no tiene actividad de invertasa. La relación molar entre la beta-fructosidasa y la fructosiltransferasa cayó en un factor de 6 después de la cromatografía de afinidad, y a 25 continuación se redujo aún más hasta una relación molar de aproximadamente tres después de la cromatografía de interacción hidrofóbica (tabla I). La actividad de beta-fructosidasa remanente no pudo separarse de la 6-SFT y por tanto parece ser una de sus propiedades catalíticas.

30 Como ya han demostrado Simmen y col., (ver arriba), la capacidad para transferir fructosa a sacarosa o a isoquiestosa es una propiedad característica de la 6-SFT. Las dos isoformas de la 6-SFT que fueron obtenidas tras la segunda columna de intercambio aniónico tienen las mismas propiedades catalíticas según el análisis de HPLC de los productos formados tras incubación con sacarosa sola o con sacarosa e isoquiestosa (Figura 1B). En presencia de sacarosa como único sustrato, se forma principalmente quiestosa, pero la sacarosa también es hidrolizada a 35 glucosa y fructosa. Tras incubación con sacarosa e isoquiestosa, se forma principalmente bifrucosa y se hidroliza mucha menos sacarosa. Esto indica que la isoquiestosa es el aceptor preferido en comparación con la sacarosa y que la actividad de beta-fructosidasa es un componente de la 6-SFT.

3. Electroforesis de gel

40 Para ilustrar la pureza de las dos isoformas de 6-SFT, se agruparon (conjunto II en la Figura 1B) las fracciones de cromatografía Resource Q que caen entre ambos picos de 6-SFT, y que por tanto contienen ambas fracciones, y se analizaron mediante análisis de gel IEF no desnaturizante combinado con un ensayo de actividad enzimática (Figura 2A) o con un análisis SDS-PAGE (Figura 2B).

Para la electroforesis bidimensional de 6-SFT, el conjunto II fue sometido a enfoque isoelectrico en un intervalo de pH de 4-8 en condiciones no desnaturizantes haciendo uso de una célula 2D Mini-Protean II (Biorad) siguiendo el protocolo del fabricante.

45 Posteriormente, los geles tubulares de 1 mm fueron cultivados durante 30 minutos en tampón de muestra 5x y cargados en un gel de poliacrilamida de SDS al 7,5-12% para una separación en la segunda dimensión (Laemmli, Nature 227, 680-685, (1970)), o fueron lavados tres veces durante diez minutos en tampón de ácido cítrico- Na_2HPO_4 (pH 5,75) 0,5 M y cortados en trozos de 2,5 mm para un ensayo de actividad enzimática. Los trozos de gel de 2,5 mm fueron incubados en tampón de ácido cítrico- Na_2HPO_4 (pH 5,75) 0,4 M con sacarosa 0,2 M y un 0,02% de NaN_3 50 durante 12 horas a 27°C. Tras centrifugar a 13.000 g durante 5 minutos se recolectó el sobrenadante, se calentó a 95°C durante 3 minutos, se suplementó con trehalosa (patrón interno, concentración final de 0,1 μ g/ μ L) y se almacenó a -20°C para análisis posteriores.

Las proteínas separadas en los geles de SDS-poliacrilamida se hicieron visibles mediante una tinción con plata (Blum, 1987).

55 Las dos isoformas se separaron claramente y ambas presentaron actividad de fructosiltransferasa e igualmente de beta-fructosidasa. Su pI difirió sólo mínimamente y estuvo próximo a pH 5,0. Tras desnaturización, ambas isoformas de 6-SFT proporcionaron en SDS-PAGE dos subunidades de 49 y 23 kDa, respectivamente. Estos datos,

y la casi completa identidad de las estructuras de los fragmentos obtenidos mediante digestión trípica (datos no mostrados) indican que las dos isoformas muestran muchas similitudes con respecto a la estructura y a la secuencia. La 6-SFT cargada negativamente (que contiene ambas isoformas) presentó aproximadamente 64 kDa, determinado mediante cromatografía de exclusión de tamaño (datos no mostrados).

5 4. Determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal

Para la determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal se cargaron 100 µg de proteínas de los conjuntos I y III de 6-SFT en un gel de gradiente (7,5-12%) y se separaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, ver arriba). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (membrana de transferencia Immobilon PVDF, Millipore Corp., Bedford, MA) haciendo uso del sistema de tampón CAPS (Matsudeira, J. Biol. Chem. 262, 10035-10038 (1987)). Las bandas de proteínas se hicieron visibles sobre la membrana con un 0,2% de Ponceau S en ácido acético al 1%, se cortaron y digirieron con tripsina.

Los péptidos tríplicos fueron separados mediante HPLC de fase inversa y la determinación de la secuencia N-terminal de péptidos tríplicos se llevó a cabo mediante degradación de Edman automatizada.

Se determinó la secuencia de péptidos del extremo N de la subunidad de 49 kDa, y ambas unidades, la grande y la pequeña, fueron digeridas con tripsina con el objetivo de obtener las secuencias de péptidos internas. Para las dos subunidades se determinaron dos secuencias de aminoácidos de péptidos tríplicos, y se usaron para diseñar cebadores de ADN (Figura 3).

5. Diseño de una sonda

Se generó un fragmento de 397 pb mediante reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Para este propósito se sintetizó ADNc de cadena sencilla mediante transcripción inversa de Poli(A⁺)-ARN haciendo uso de un cebador sintético oligo-d(T) (23mero) y transcriptasa inversa M-MuL V. Se llevó a cabo la PCR de acuerdo con el protocolo de Perkin-Elmer entre los dos cebadores sintéticos degenerados:

(i) CGCCTGCAGGTACCACATGTT(C/T)TA(C/T)CA(A/G)TA(C/T)AA(C/T)CC

(ii) CCACGTCTAGAGCTCTC(A/G)TC(A/G)TACCA(A/C/G)GC(C/G)GTCAT

Estos cebadores fueron diseñados según secuencias de dos partes de los péptidos obtenidos después de digestión trípica de la 6-SFT. El producto de PCR resultante se clonó en el vector pCR-IITM (kit TA-cloning, Invitrogen). El etiquetado del fragmento con α-³²P-dATP se llevó a cabo con un kit de etiquetado de marcado aleatorio (Boehringer GmgH, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

6. Escrutinio de una biblioteca de ADNc

El fragmento de 397 pb generado de acuerdo con el método del apartado 5 se usó como sonda en un análisis de tinción de gel de ARN de hojas principales, en las que se indujo la acumulación de fructanos mediante exposición continua a luz durante diferentes tiempos. Se descubrió que no había señal de hibridación en el caso de las hojas no tratadas, mientras que se acumuló rápidamente una banda de hibridación de aproximadamente 1800 pb de un modo que correspondía con el aumento de la actividad de 6-SFT en las hojas (datos no mostrados). Este resultado apunta a la presencia de un ARN mensajero de aproximadamente 1800 pb de longitud.

El producto de PCR también se usó para realizar un escrutinio de una biblioteca de expresión de ADNc de hojas principales. En este caso se realizó una búsqueda de un ADNc de longitud completa.

Con este objetivo en primer lugar se fabricó una librería de expresión de ADNc extrayendo el ARN total de hojas principales cortadas de 8 días de edad en las que se había inducido la síntesis de fructanos mediante una exposición continua a luz durante 48 horas. Las hojas fueron molidas en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se suspendió en tampón de extracción de ARN (Tris 0,1 M (HCl), pH 9, con EDTA 10 mM, NaCl 0,1 M y DTT 25 mM). La muestra aún congelada se volvió a moler hasta obtener una consistencia de crema, y a continuación la muestra fue extraída con fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1; v:v:v) (Brandt e Ingversen, Carlsberg Res. Commun. 43, 451-469, 1978). El método se modificó ligeramente para omitir la segunda etapa de homogenización y precipitar el ARN durante la noche con LiCl 2M a 4 °C tras la última extracción con cloroformo. Después de una precipitación final en etanol, se aisló poli (A)⁺-ARN mediante cromatografía de poli(U)-Sefarosa (Brandt e Ingversen, ver anterior) y se usó para la síntesis de ADNc (Kit de síntesis ZAP-cDNA, Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.).

El ADNc se ligó en un vector uni-ZAP-XR, se digirió con EcoRI y XhoI y se empaquetó en partículas de fago (Kit de empaquetamiento Gigapack III, Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) (7,5 x 10⁷ unidades formadoras de plaqueta por 5 µg de poli(A)⁺-ARN).

La biblioteca primaria se escrutó con el fragmento de 397 pb de longitud marcado con α-³²P de la 6-SFT (ver arriba) a 60°C de acuerdo con el protocolo de Stratagene. Los clones positivos fueron escrutados una vez más y finalmente

los fagémidos Bluescript fueron separados de los fagos positivos resultantes usando el sistema Exassist/SOLR (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). La determinación de la secuencia de ADN de ambas cadenas se llevó a cabo mediante el método de determinación de secuencia de dideoxinucleótidos, haciendo uso del kit de secuenciación PRO (Toyobo, Osaka, Japón). A menos que se indique lo contrario, se usaron los protocolos estándares (Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)). El análisis de datos de secuencia se llevó a cabo usando el paquete de software de análisis de secuencia GCG, versión 7.2 (1992).

Tras el primer escrutinio se aislaron 9 clones positivos. Tras otro escrutinio 7 clones seguían siendo positivos. De éstos, se determinó parcialmente la secuencia a partir del extremo 5' y a partir de los cebadores internos que fueron diseñados en base al producto de PCR. Todos los 7 clones parecieron codificar para la misma proteína, y cuatro de ellos contenían la secuencia de codificación completa. De uno de los posibles clones de longitud completa se determinó totalmente la secuencia de ambas cadenas y se descubrió que codificaba para un polipéptido que contenía la subunidad de 49 kDa, así como la subunidad de 23 kDa (Figura 3).

En la Figura 4 se muestra una vista esquemática de la secuencia de nucleótidos completa del ADNc secuenciado completamente. Comprende un marco de lectura abierto largo que comienza en el nucleótido 46 y termina en el nucleótido 1923 para dos codones de parada. El marco de lectura abierta codifica para una cadena de polipéptido de 626 aminoácidos que incluyen una secuencia líder de 67 residuos de longitud.

La 6-SFT madura comienza en el nucleótido 246 y por tanto tiene al menos 559 residuos de aminoácido con un peso molecular calculado de 61,3 kDa y un pI calculado de 5,37. Todas las 5 secuencias de aminoácidos parciales obtenidas de la proteína purificada están presentes en la secuencia de aminoácidos derivada del ADNc (Figura 4). Asimismo, el ADNc contiene 45 pb de una secuencia 5' no traducida y 171 pb de una secuencia 3' no traducida con una cola de poli(A). Una posible señal de inicio de la traducción (ATG) del ADNc de 6-SFT está localizada en las posiciones de nucleótido 46 a 48 y una posible secuencia poliadenilante está presente en las posiciones de nucleótidos 1973 a 1979. Se ha descubierto que la 6-SFT madura presenta unión reversible de alfa-metil-manósida en ConA-Sefarosa, lo que indica que es una glicoproteína (datos no mostrados). De forma similar, la secuencia de aminoácidos derivada contiene 6 posibles posiciones glicosilantes (Asn-X-Ser/Thr).

Todas las secuencias de péptidos obtenidas a partir de la proteína purificada están situadas sin ninguna falta de coincidencia con la secuencia de aminoácidos derivada. Las dos secuencias de péptidos obtenidas a partir de la subunidad de 23 kDa de la SFT purificada están localizadas cerca del extremo 3' del ADNc, mientras que las secuencias obtenidas a partir de la subunidad de 49 kDa están localizadas en la vecindad del extremo 5'.

Con el objetivo de estudiar la posible relación del ADNc con las beta-fructosidasas y fructosiltransferasas conocidas, se comparó la secuencia de aminoácidos derivada con la secuencia de diferentes invertasas vegetales, fúngicas y bacterianas, y con levanasas y levansacararas bacterianas (Figura 5 y Figura 6). El ADNc descrito en la presente memoria tiene la mayor homología con las invertasas de ácido soluble de semilla de soja verde ("mungbean") (Arai y col., ver arriba), de zanahoria (Unger y col., ver arriba) y de tomate (Elliot y col., ver arriba), e igualmente claras homologías con invertasas, levanasas y levansacararas de otros reinos, es decir, con una serie de beta-fructosidasas. La comparación de la secuencia de aminoácidos indica al menos cinco dominios bien conservados. Los dominios I y IV están menos conservados entre las invertasas y las levansacararas que los dominios II, III y V. Con estas enzimas, el dominio III en particular está muy conservado. Sorprendentemente, la homología más limitada es la que se obtiene con las levansacararas bacterianas, es decir, con una clase de enzimas que catalizan una reacción de transferencia de 6-fructosilo similar a la 6-SFT (véase el dendrograma de la Figura 6).

7. Expresión de 6-SFT en protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*

El clon de ADNc de 6-SFT fue subclonado en un derivado del vector de plásmido pUC119 (Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) bajo la regulación de las señales de expresión de transcrito de virus de mosaico de la coliflor 35S (véase Neuhaus y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10362-10366 (1991)).

Se aislaron protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia* y se transformaron básicamente como describen Goodall y col. (Meth. Enzymol. 181, 148-161 (1990)). Brevemente, se dispersaron 10 µg del plásmido que contenía el ADNc de 6-SFT en un volumen de 10 µL de tampón TE en tubos de plástico esterilizado de 15 mL. Se llevaron a cabo transformaciones de control con 10 µg del mismo plásmido sin injerto. Se añadieron 1×10^6 protoplastos hasta un volumen de 0,5 mL y se mezclaron cuidadosamente con un volumen igual de polietilenglicol 6000 al 20% (p/v). Tras 2-5 minutos se añadieron 6,5 mL de medio K3 y se incubaron los protoplastos durante dos horas a 27°C. Después de eso fueron diluidos 1:1 con el osmoticum W5 y peletizados durante 10 minutos a 1000 g. Todos los protoplastos (excepto los que fueron tomados como control a $t = 0$ horas) fueron resuspendidos en 2 mL de medio K3 e incubados a 27°C. Después de 3, 6, 9, 18 y 27 horas se tomaron muestras para analizar el producto. En este caso los protoplastos fueron peletizados durante 10 minutos a 1000 g después de la adición de 2 mL de osmoticum W5. La partícula de protoplastos fue resuspendida en tampón 0,1 M de ácido cítrico- Na_2HP_4 (pH 5,75), transferidos a tubos Eppendorf esterilizados y congelados en nitrógeno líquido. Después de descongelar, las muestras fueron sometidas a vórtice, y los restos celulares fueron peletizados a 13.000 g durante 3 minutos. Los sobrenadantes (de 50 a 100 µL) fueron desalinizados haciéndolos pasar por columnas Biogel P-10 tal como se ha descrito antes. Las

muestras de enzima desalinizadas fueron incubadas con sacarosa 0,1 M o con sacarosa 0,1 M en combinación con isoquestosa 0,1 M en tampón 50 mM de ácido cítrico- Na_2HP_4 (pH 5,75), con un 0,02% de NaN_3 durante 20 horas a 27°C. El análisis de los productos se realizó tal como se ha descrito para el caso de la Figura 1 después de detener la reacción calentando las muestras a 95°C durante 3 minutos.

5 Después de una fase de transición inicial de aproximadamente 3 horas, los extractos de los protoplastos formaron
 10 questosa a partir de sacarosa y bifurcosa a partir de sacarosa e isoquestosa. Esto confirma que el ADNc codifica para una 6-SFT funcional (Figura 6). Como la enzima purificada, la actividad presente en los protoplastos catalizó la
 15 producción de bifurcosa procedente de sacarosa y de isoquestosa a una velocidad que es aproximadamente cuatro veces superior a la de producción de isoquestosas a partir de sacarosa. Estos resultados confirman que el ADNc
 20 codifica para una 6-SFT.

8. Expresión del gen de 6-SFT en plantas

15 El ADNc de 6-SFT fue clonado entre un promotor 35S específico de planta y una señal de terminación que se origina en el gen de nopalina sintasa. Esta construcción génica quimérica (35S-6SFT-NOS) fue insertada posteriormente en un derivado del vector de planta binario pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids. Res. 12, 8711-8721). Esto dio como resultado el plásmido pVDH280. Este plásmido fue conjugado en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema y col.,
 20 Nature 303, 179-180 (1983)) en un cruce de tres puntos haciendo uso del plásmido colaborador pRK-2013 (Lam, Plasmid 13, 200-204 (1985)). La construcción se introdujo en *Nicotinia tabacum* var. Samsun NN usando el método de transformación de disco de hoja (Horsch y col., Science 227, 1229-1232 (1985)). Las plantas regeneradas fueron
 25 seleccionadas en función de la resistencia a canamicina, se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, Physiol. Plant. 15, 473-497 (1962)) y se analizaron.

Se cortó material de hoja de las plantas de control no transgénicas *in vitro*, así como de las plantas transgénicas *in vitro* 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10 y 11, y se molió en un tubo Eppendorf. Tras centrifugación (2 minutos a 16.000 rpm) se
 25 analizaron 200 μL por medio de un sistema Dionex DX-300 con una columna PA-100 y Detección Amperométrica de Pulsos, y elución con un gradiente de NaOH/NaAc hasta el 100% de NaOH . Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 8.

En ningún caso se obtuvieron oligosacáridos en plantas naturales (C1) o en plantas que fueron transformadas con
 30 construcciones no relacionadas (Figura 8). El escrutinio de los transformantes mostró con el uso de estos métodos plantas acumuladoras de oligosacáridos con un DP que, en base a la serie de inulina, se estima que está entre 3 y 5 y entre 8 y 9. Los niveles de expresión variaron entre las plantas individuales transformadas con la misma construcción. Esto es un fenómeno normal en experimentos de transformación en plantas. La variación de los
 35 niveles de expresión depende sustancialmente de la posición de integración en el genoma (efecto de posición).

Tras la adición de 100 ng de 6-questosa al extracto de transformante nº 4, se volvió a registrar un espectro. La
 35 Figura 8 indica que en el caso del transformante nº 4 se forman oligosacáridos con enlaces de tipo 2-6, ya que se observa un pico mayor en comparación al espectro sin 6-questosa. Por tanto, el pico probablemente corresponde a 6-questosa.

Ejemplo 2

Aplicabilidad a otras especies vegetales

40 A fin de ilustrar la aplicabilidad general de la tecnología, las construcciones descritas en el ejemplo precedente fueron introducidas en diferentes cultivos. De este modo, la patata fue transformada de acuerdo con el método descrito en Visser, Plant Tissue Culture Manual 35, 1-9, Kluwer Academic Publishers, 1991. Las plantas transgénicas resultantes acumularon oligosacáridos en todos los órganos evaluados. También se introdujo la misma construcción en la remolacha (*Beta vulgaris* L.) que se transformó tal como se ha descrito en D'Halluin y col.,
 45 Biotechnology 10, 309-314 (1992). Las plantas de remolacha transgénica resultantes acumularon cantidades significativas de oligosacáridos en, por ejemplo, sus hojas y raíces. Se introdujeron las mismas construcciones en *Brassica napus* L., que fue transformada de acuerdo con Block y col., Plant Physiol. 91, 694-701 (1989). Las plantas transgénicas resultantes acumularon niveles significativos de oligosacáridos en, por ejemplo, sus hojas y órganos de almacenamiento. Por supuesto, no es esencial que las plantas sean transformadas de la manera indicada. También se pueden usar otros métodos al alcance del especialista en la técnica.

50 Los ejemplos de otras especies vegetales que pueden ser modificadas comprenden, aunque sin limitación, el maíz (*Zea mays* L.), el trigo (*Triticum aestivum* L.), la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.), la semilla de soja (*Glycin max* L.), el guisante (*Pisum sativum* L.), la habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.), la escarola (*Cichorium intybus* L.), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), la batata (*Dioscorea esculenta* L.), la mandioca (*Manihot esculenta* L.) y las hierbas (por ejemplo, *Lolium* spp., *Poa* spp. y *Festuca* spp.).

55 Las plantas con modelos de separación de carbohidratos modificados inducidos pueden ser plantas diana preferidas para la introducción de genes sintetizadores de oligosacáridos. Dichas plantas comprenden, aunque sin limitación, mutantes naturales en el metabolismo de almidón y sacarosa, y plantas en las que el metabolismo de almidón y

sacarosa es modificado por medio de técnicas genéticas y moleculares, como se describe, por ejemplo, en Sonniewald y Willmitzer, Plant Physiology 99, 1267-1270 (1992).

Ejemplo 3

Uso de los oligosacáridos de acuerdo con la invención

5 Los oligosacáridos producidos usando el método de acuerdo con la invención pueden usarse como sustitutos de azúcar en diferentes productos. A continuación se muestran tres ejemplos de los mismos.

1. Helado

El helado se prepara con los siguiente ingredientes:

- 635 partes de agua
- 10 90 partes de mantequilla
- 100 partes de leche en polvo baja en grasa
- 170 partes de oligosacáridos de acuerdo con la invención
- 5 partes de Cremodan SE30® (Grindsted)
- 0,3 partes de Aspartame®
- 15 aromatizantes según se requiera.

La leche en polvo se disuelve en el agua. El total se calienta a 40-45°C. El resto de ingredientes secos se mezclan y se disuelven en la leche tibia. A continuación se añade la mantequilla fundida. Entonces el total se pasteuriza durante 10 minutos a 72°C. Después la mezcla se homogeniza en un homogeneizador de dos etapas a 150/35 bar. La mezcla de hielo obtenida de este modo se enfría rápidamente hasta 5°C y el total se deja posteriormente madurar durante un mínimo de 4 horas a 5°C. Finalmente, la mezcla de hielo se airea y se congela con un exceso del 100%.

Tras endurecer a -35°C y almacenar a -20°C, se obtiene un helado que corresponde en términos de sabor y textura a un helado preparado con azúcares naturales (sacarosa, jarabe de glucosa).

2. Barrita de muesli

Se preparó una barrita de muesli a partir de los siguientes ingredientes:

- 25 28 partes de oligosacáridos de acuerdo con la invención
- 68 partes de mezcla de muesli
- 4 partes de cacao

Se produjo un jarabe a partir de los oligosacáridos mediante calefacción, jarabe que se mezcló con los otros ingredientes. Las barritas fueron conformadas con la mezcla así formada en una prensa cilíndrica. Debido a la omisión de azúcar natural, la barrita es mucho menos calórica que las barritas convencionales.

3. Bebida de refresco

Se preparó una bebida de refresco a partir de los siguientes ingredientes:

- 90 partes de agua o de zumo de fruta
- 8-10 partes de oligosacáridos de acuerdo con la invención
- 35 edulcorantes artificiales
- agentes aromatizantes y colorantes
- ácido nutriente
- dióxido de carbono

40 Todos los ingredientes fueron disueltos en una parte del agua. El resto del agua se añadió a continuación como agua que contiene dióxido de carbono. El valor energético de la bebida de refresco es muy inferior debido a que no se añadieron azúcares naturales adicionales.

Tabla I

Purificación de 6-SFT

Etapa de purificación	Fructosiltransferasa		Proteína mg	Purificación veces	β -fructosidasa/ fructosiltransferasa ^b relación molar
	nkatal ^c	%			
Extracto crudo	243	100	5000	1	32
Precipitación ácida	159	66	1700	2	29
High-Trap-blue	71,6	29	450	3	5,7
Primera Resource Q	22,6	9,3	79	6	6,2
Alcyl Superosa	9,32	3,8	56	4	3,2
Superdex 75	6,64	2,7	9,5	15,	3,4
Segunda Resource Q Conjunto I	2,99	1,2	0,6	103	2,7
Segunda Resource Q Conjunto II	4,33	1,8	1,7	52	3,2

^a medida como actividad productora de questosa.^b mol de fructosa por mol producido de fructosa^c nkatal = nmol·s⁻¹

5

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para producir una mezcla de oligosacáridos que tienen una longitud de cadena de moléculas individuales que se encuentra sustancialmente entre 2 y 8, método que comprende las etapas de:
- 5 a) seleccionar un gen de origen vegetal que codifique para una enzima que sea capaz de convertir sacarosa en un oligosacárido;
- b) unir el gen a señales de inicio de transcripción y de terminación de transcripción adecuadas, con el fin de proporcionar una construcción de expresión;
- c) transformar una célula vegetal adecuada con la construcción de expresión;
- d) regenerar una planta transgénica a partir de la célula vegetal transformada;
- 10 e) cultivar la planta transgénica en condiciones que permitan la expresión y la actividad de la enzima; y
- f) aislar los oligosacáridos de la planta transgénica
- en donde el gen de las etapas a) y b) codifica para sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT), que tiene la secuencia de aminoácidos de la Figura 4.
- 15 2.- El método reivindicado en la reivindicación 1, en el que la construcción de expresión además comprende al menos una secuencia señal diana.
- 3.- El método reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la construcción de expresión además comprende al menos un potenciador.
- 4.- La construcción de ADN para expresar una enzima capaz de convertir sacarosa en oligosacáridos en una planta o célula vegetal, que comprende un gen que codifica para la enzima, acoplado en un marco de lectura a señales de inicio y de terminación de la transcripción específicas, en donde el gen codifica para la enzima sacarosa-fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT) que tiene la secuencia de aminoácidos de la Figura 4.
- 20 5.- Una célula vegetal transgénica, que comprende la construcción de ADN reivindicada en la reivindicación 4.
- 6.- Una planta transgénica que comprende la construcción de ADN de la reivindicación 5, que se puede obtener mediante regeneración a partir de una célula vegetal transgénica como la reivindicada en la reivindicación 5.
- 25 7.- Un tejido vegetal transgénico que comprende la construcción de ADN de la reivindicación 4, que procede de una planta como la reivindicada en la reivindicación 6 ó que se puede obtener mediante regeneración a partir de una célula vegetal transgénica como la reivindicada en la reivindicación 5.

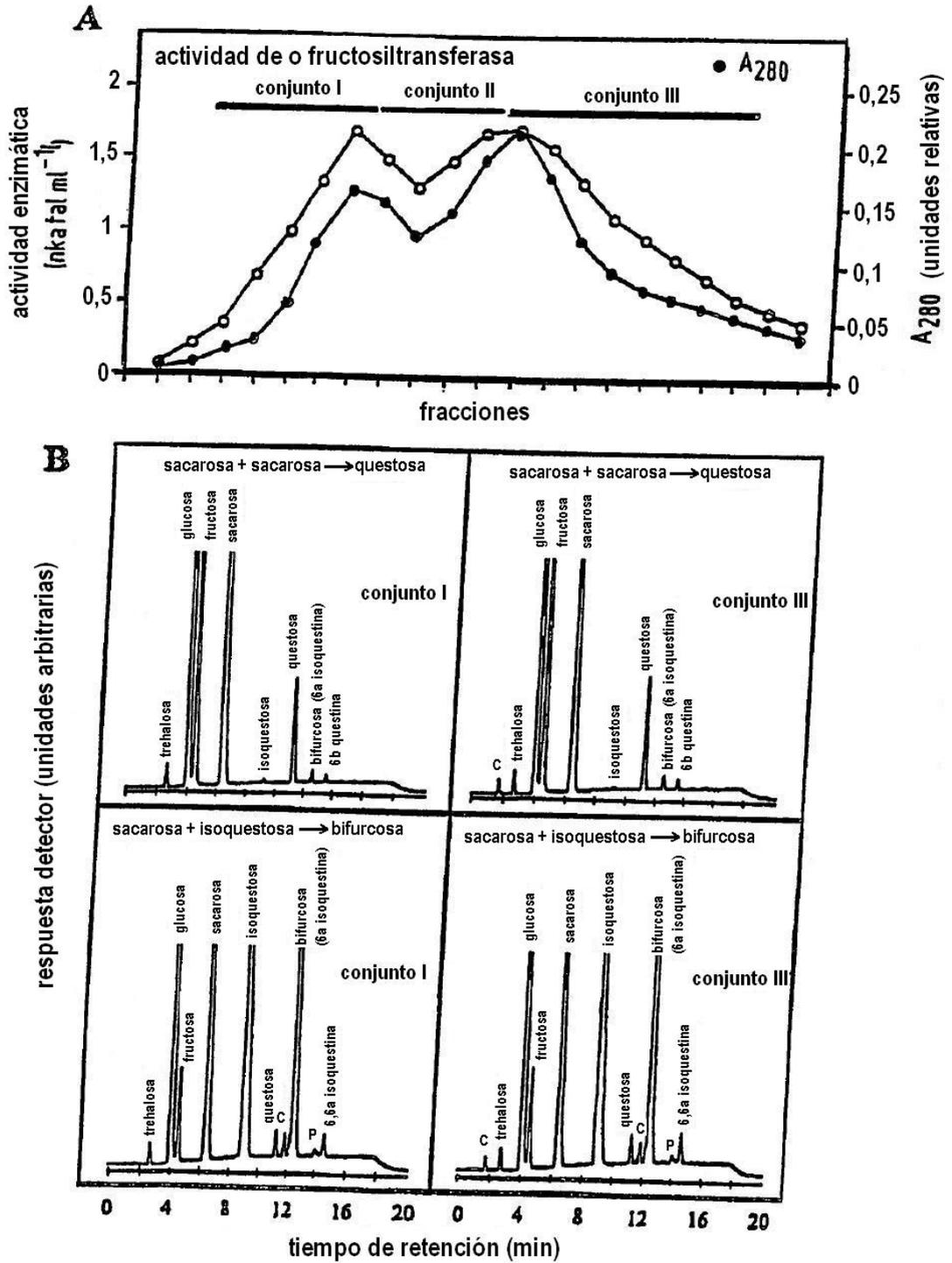


FIGURA 1

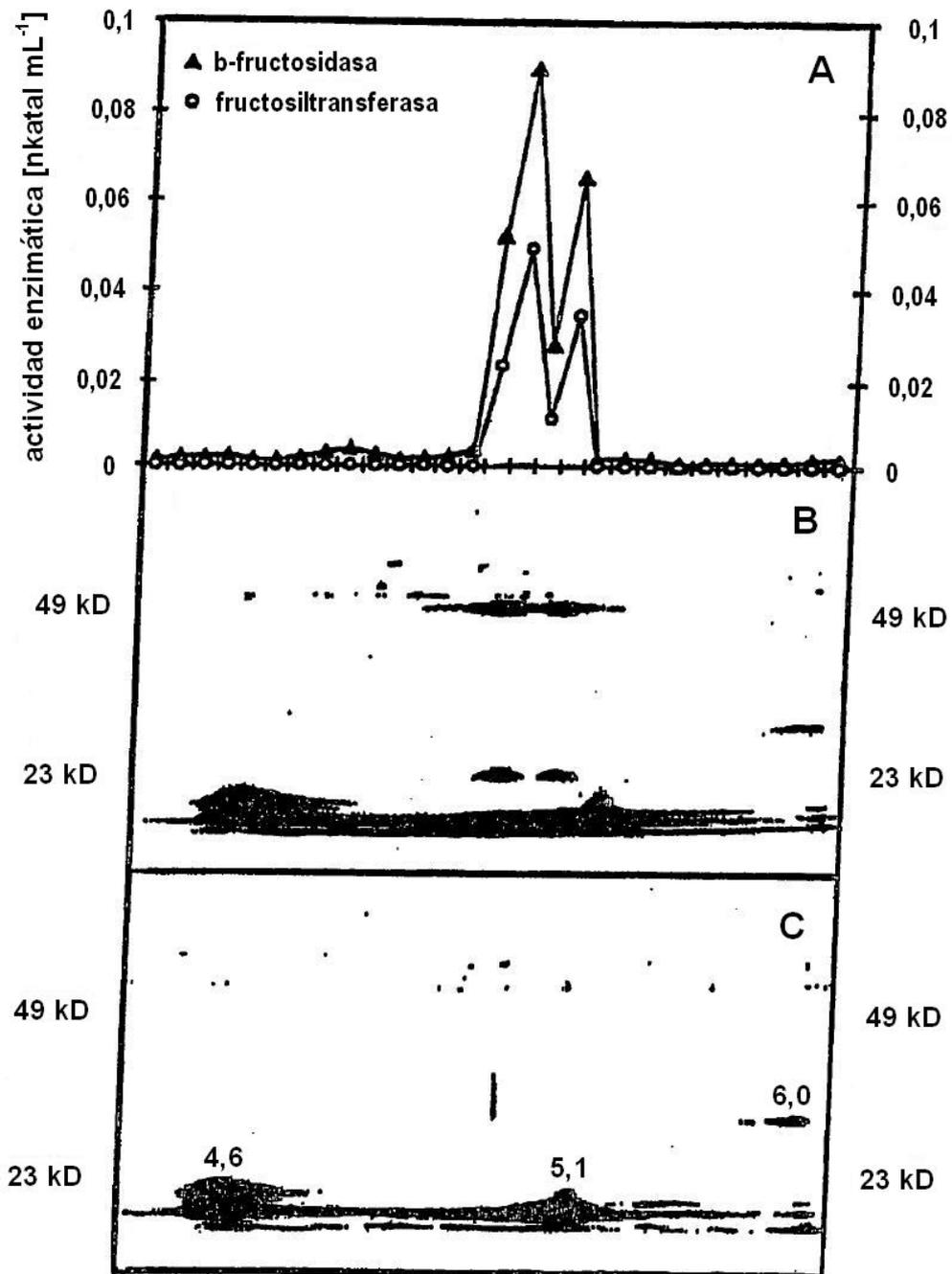


FIGURA 2

Secuencia de ADNc que codifica 6-SFT de cebada

GCTCAGAATCTACCAAACCCCTCTCGGAGTTGACGAGCGGCGCCGCATGGGGTCACACGGC
MetGlySerHisGly

AAGCCACCGCTACCGTACGGCTACAAGCCGCTGCCCTCGGACGCGCCGACGGTAAAGCGG
LysProProLeuProTyrAlaTyrLysProLeuProSerAspAlaAlaAspGlyLysArg

ACCGGCTGCATGAGGTGGTCCCGGTGGCCACCGTGTGACGGCCCTCGGCATGGCGGTG
ThrGlyCysMetArgTrpSerAlaCysAlaThrValLeuThrAlaSerAlaMetAlaVal

GTGGTGGTGGGCGCCACGCTCCTGGCGGATTGAGGATGGAGCAGGCCGTGACGAGGAG
ValValValGlyAlaThrLeuLeuAlaGlyLeuArgMetGluGlnAlaValAspGluGlu

GCGGCGGGCGGGTCCCGTGGAGCAACGAGATGCTGCGAGTGGCAGCGCAGCGGTAC
AlaAlaAlaGlyGlyPheProTrpSerAsnGluMetLeuGlnTrpGlnArgSerGlyTyr

CATTTCCAGACGGCAAGAACTACATGAGCGATCCCAACGGCCTGATGATTACCGTGG
HisPheGlnThrAlaLysAsnTyrMetSerAspProAsnGlyLeuMetTyrTyrArgGly

TGGTACCACATGTTCTACAGTACAACCGGTGGGCACCGACTGGACGACGGCATGGAG
TrpTyrHisMetPheTyrGlnTyrAsnProValGlyThrAspTrpAspAspGlyMetGlu

TGGGGCCACGCGGTGTCGGGAACCTTGTCCAATGGCGCACCCCTCCTATCGCCATGGT
TrpGlyHisAlaValSerArgAsnLeuValGlnTrpArgThrLeuProIleAlaMetVal

GCGACCACTGGTACGACATCCTCGGAGTCCTCTCGGGCTCCATGACGGTCTACCCAAC
AlaAspGlnTrpTyrAspIleLeuGlyValLeuSerGlySerMetThrValLeuProAsn

GGGACGGTCATCATGATCTACCGGCGCCCAACCGCCTCCCGCGTGGAGGTCCAGTGC
GlyThrValIleMetIleTyrThrGlyAlaThrAsnAlaSerAlaValGluValGlnCys

ATCGCCACCCCGCCGACCCCAACGACCCCTCCTCCCGCGTGGACCAAGCACCCCGCC
IleAlaThrProAlaAspProAsnAspProLeuLeuArgArgTrpThrLysHisProAla

AACCCCGTCATCTGGTCCCGCGGGGTGGCACCAAGGATTTCCGAGACCCGATGACC
AsnProValIleTrpSerProProGlyValGlyThrLysAspPheArgAspProMetThr

GCCTGGTACGAGTCCGACGAGACATGGCGCACCCCTCCTCGGGTCCAAAGGACGACC
AlaTrpTyrAspGluSerAspGluThrTrpArgThrLeuLeuGlySerLysAspAspHis

GACGGCCACACGACGGCATCGCCATGATGTACAAGACCAAGGACTTCTCAACTACGAG
AspGlyHisHisAspGlyIleAlaMetMetTyrLysThrLysAspPheLeuAsnTyrGlu

CTCATCCCGGCATCTTGCACCGGGTGGTCCGACCCGCGAGTGGAGTGCATCGACTTC
LeuIleProGlyIleLeuHisArgValValArgThrGlyGluTrpGluCysIleAspPhe

TACCCGTCGGCCGGAAGCAGCGACAACCTCGTGGGAGATGCTGCACGTGTTGAAGCG
TyrProValGlyArgArgSerSerAspAsnSerSerGluMetLeuHisValLeuLysAla

AGCATGGACGACGAACGGCAGACTACTACTCGCTGGGCAGTACGACTCGCGGCAAC
SerMetAspAspGluArgHisAspTyrTyrSerLeuGlyThrTyrAspSerAlaAlaAsn

ACGTGGACGCCCATCGACCCGGAGCTCGACTTGGGGATCGGGCTGAGATACGACTGGGA
ThrTrpThrProIleAspProIleLeuAspLeuGlyIleGlyLeuArgTyrAspTrpGly

AAGTTTATGCGTCCACCTCCTTCTATGATCCGGCCAAGAACCAGCGCGTGCATGGGG
LysPheTyrAlaSerThrSerPheTyrAspProAlaLysAsnArgArgValLeuMetGly

TACGTGGCGAGTCCGACTCCAAGCGGGCTGATGTCGTCAAGGATGGGCTTCCATTAG
TyrValGlyGluValAspSerLysArgAlaAspValValLysGlyTrpAlaSerIleGln

TCAGTTCCTAGGACGGTGGCTCTGGATGAGAAGACCCGGACGAACCTCCTGCTGCCCC
SerValProArgThrValAlaLeuAspGluLysThrArgThrAsnLeuLeuLeuTrpPro

GTTGAGGAGATCGAGACCTTCCGCTCAATGCCACGGAAC TGACCGACGTTACCATTAA

FIGURA 4

ValGluGluIleGluThrLeuArgLeuAsnAlaThrgluLeuThrAspValThrIleAsn
 ACTGGCTCCGTCATCCATATCCCCTCCGCCAAGGCACTCACGCTCGACATGCGGAGGCC
 ThrGlySerValIleHisIleProLeuArgGlnGlyThrHisAlaArgHisAlaGluAla
 TCTTTCCACCTTGATGCTTCCGCCGTGGCTGCCCTCAACGAGGCCGATGTGGGCTACAAC
 SerPheHisLeuAspAlaSerAlaValAlaAlaLeuAsnGluAlaAspValGlyTyrAsn
 TGCAGTAGCAGCGCGCGCTGTTAACCGCGGCGCGCTAGGCCCTTCGGCCTCCTCGTC
 CysSerSerSerGlyGlyAlaValAsnArgGlyAlaLeuGlyProPheGlyLeuLeuVal
 CTCGCCCGCGGTGACCGCGGTGGCGAGCAAACGGCGGTCTACTTCTACGTGTCTAGGGC
 LeuAlaAlaGlyAspArgArgGlyGluGlnThrAlaValTyrPheTyrValSerArgGly
 CTTGACGGAGGCCTCCACACCAGCTTCTGCCAAGATGAGCTGAGATCGTCACGAGCCAAAG
 LeuAspGlyGlyLeuHisThrSerPheCysGlnAspGluLeuArgSerSerArgAlaLys
 GATGTGACCAAGCGTGTCTATCGGGAGCACGGTGGCGGTGCTCGACGGTGAGGCTTTGTCA
 AspValThrLysArgValIleGlySerThrValProValLeuAspGlyGluAlaLeuSer
 ATGAGGGTGTCTCGTGATCACTCCATCGTGACGGCTTCGACATGGCGGGAGGACCACG
 MetArgValLeuValAspHisSerIleValGlnGlyPheAspMetGlyGlyArgThrThr
 ATGACCTCCCGGTGTACCCGATGGAGTCGTATCAGGAGGCAAGAGTCTACTTGTTCAC
 MetThrSerArgValTyrProMetGluSerTyrGlnGluAlaArgValTyrLeuPheAsn
 AACGCCACCGGTGCCAGCGTGACGGCGGAAGGCTGGTCTGCACGAGATGGACTCGGCA
 AsnAlaThrGlyAlaSerValThrAlaGluArgLeuValValHisGluMetAspSerAla
 CACAACCAGCTCTCCAATGAGGACGATGGCATGTATCTTCATCAAGTTCTTGAATCTCGT
 HisAsnGlnLeuSerAsnGluAspAspGlyMetTyrLeuHisGlnValLeuGluSerArg
 CATTAAATAAGCTACATTGGATCAAGAAGATCACCAGGGAAAGGCAATTCTATACATAAAT
 His
 CGAATCATTCCTGCACAACCTCGCTTGCAGCRTGCATTGAACATCTGTATTTGGATCATC
 TTCTTCATTTATGTCATAGTGAACATATATTACTTTGTAAAAA

FIGURA 4 (continuación)

FIGURA 5

H. v.	6aft	86	115	125	132	157	164	220	229	280	290	343	353
V. x.	Inv	HFQLeKvNY . hsdwEwELwY . . YrGwYBwFYQvNP	hMwGhAVS	hMwGhAVS	DFRDPFTwvY	eWECIDFYvPg	eWECIDFYvPg	DwGk . FYASTsF					
D. c.	Inv	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
L. e.	Inv	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
D. c.	cwInv	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
A. s.	Inv	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
E. ó.	Inv	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
S. m.	Scrib	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
B. p.	LeJa	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
B. s.	Sacc	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
K. m.	Inu	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
S. c.	Inv1	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
S. o.	Inv	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
A. n.	Inv	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
B. a.	SacB	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
B. s.	SacB	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
S. n.	SacB	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					
Z. m.	LevU	HFQPEKwM . hMDFwGPIY . . YrGwYBwFYQvNP	IVwGhAVS	IVwGhAVS	DFRDPFTwvY	MWECVDFFPVS	MWECVDFFPVS	DwGk . FYASTsF					

I

II

III

IV

V

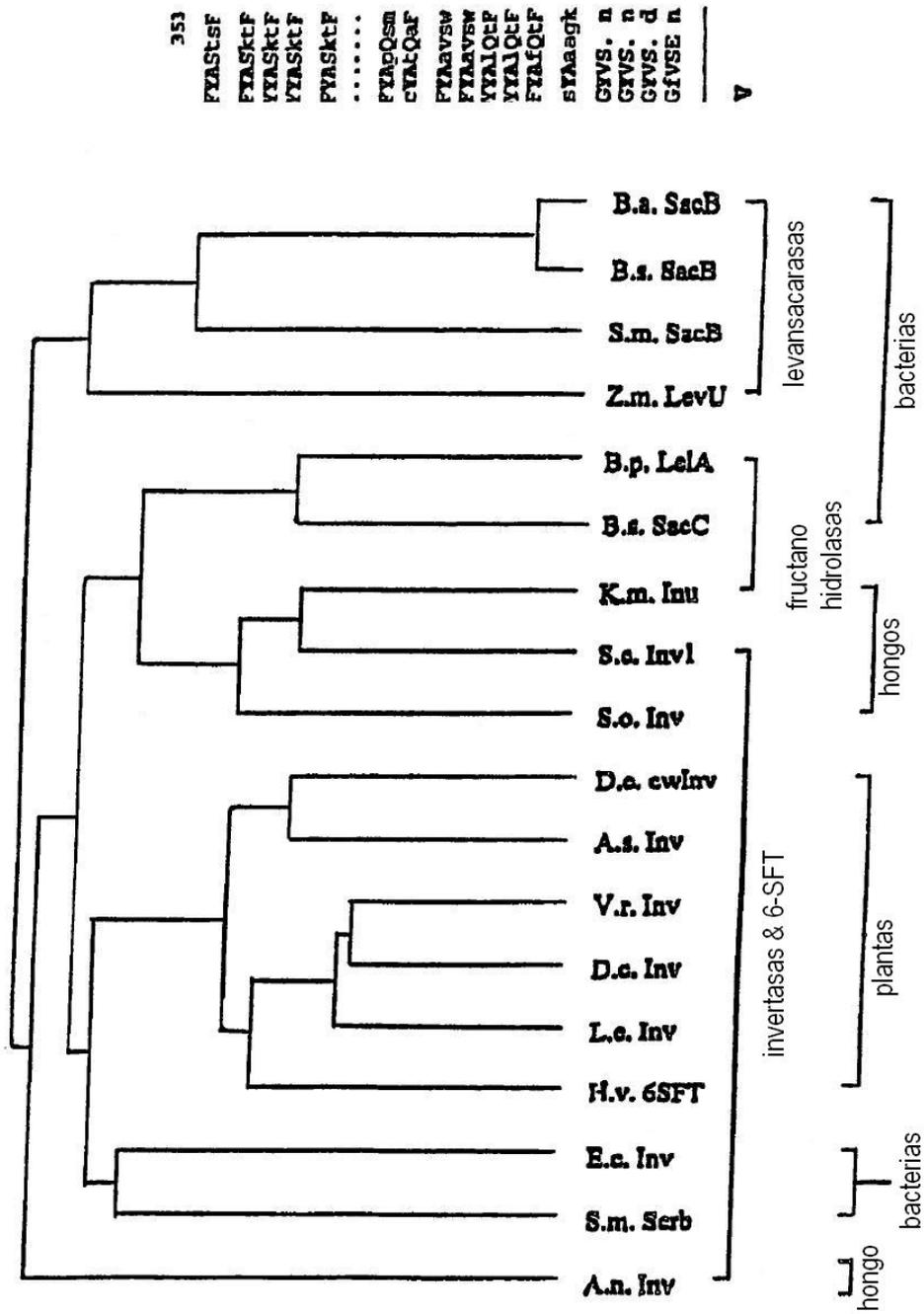


FIGURA 6

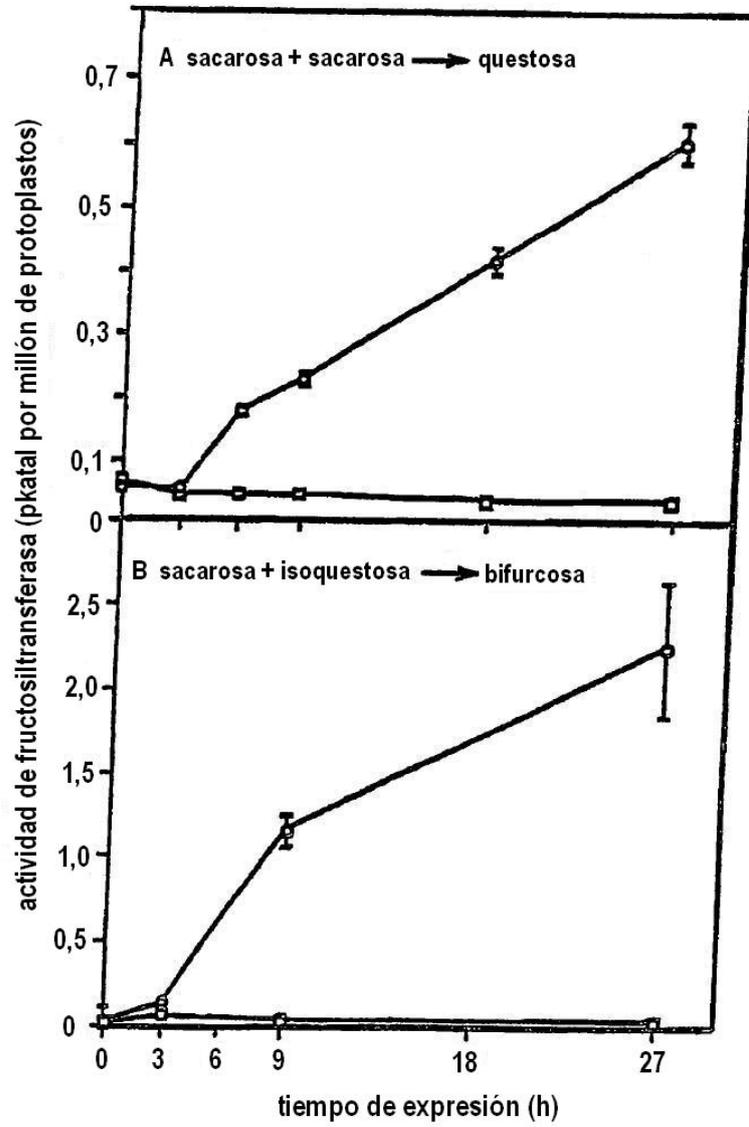


FIGURA 7

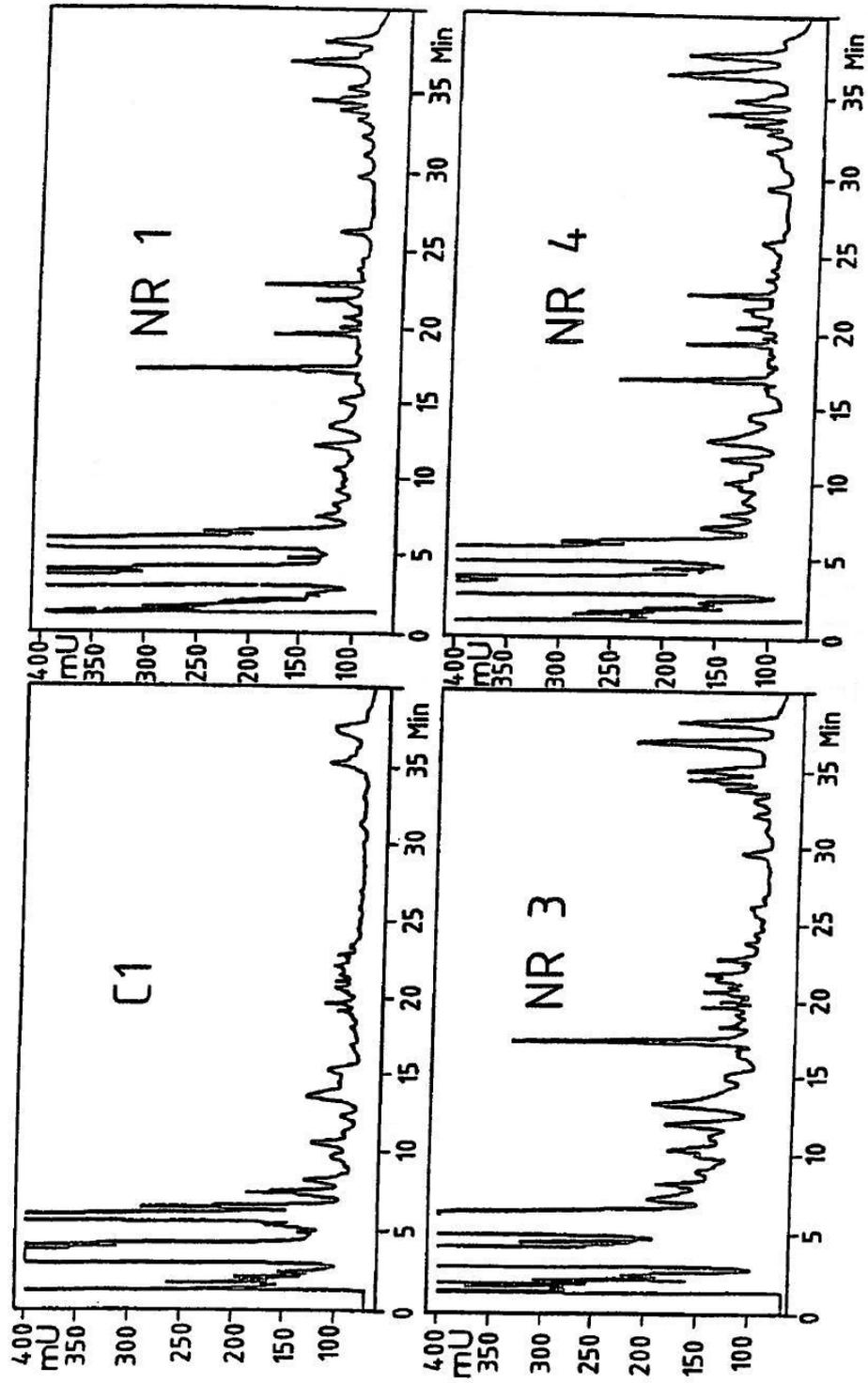


FIGURA 8A

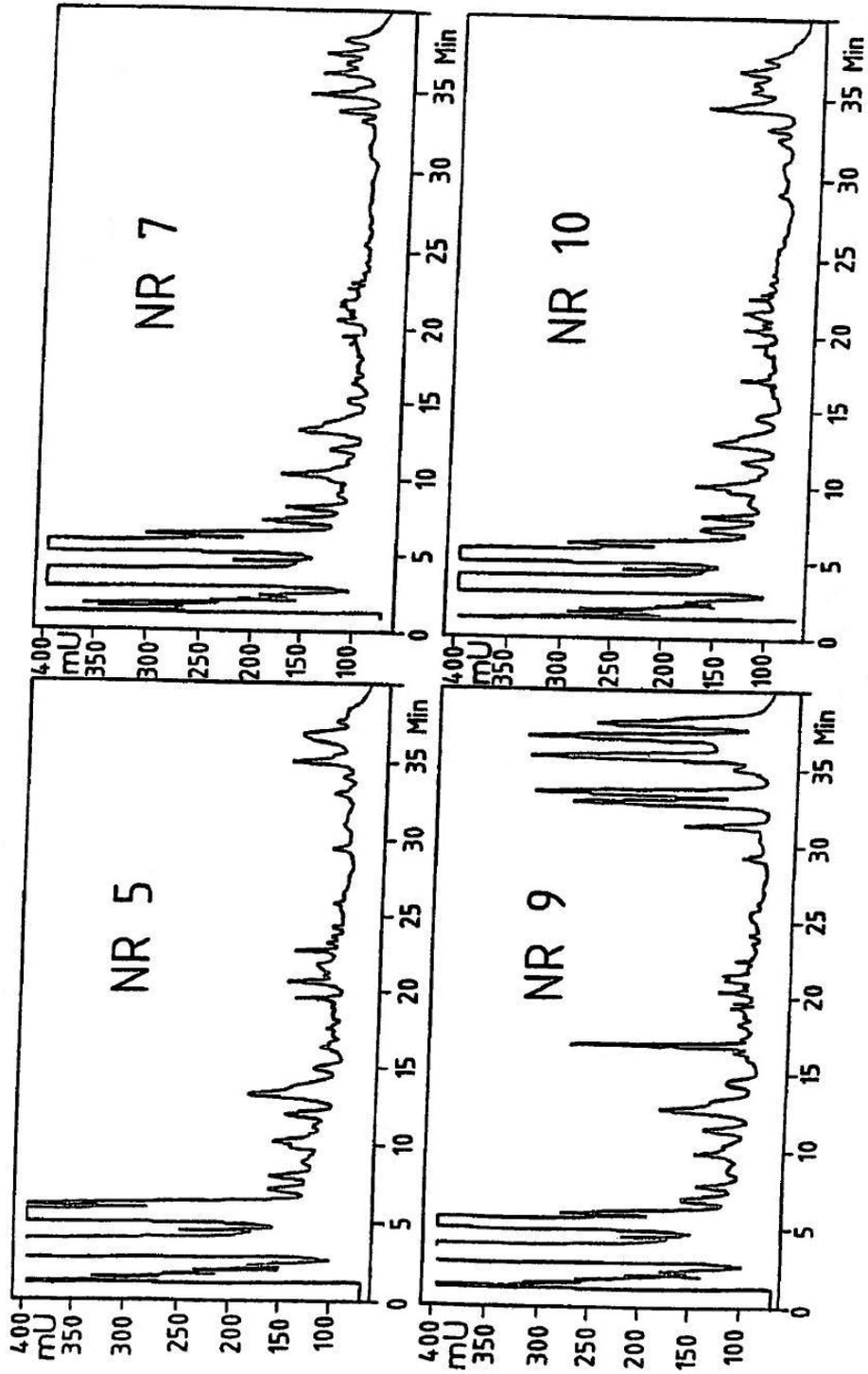


FIGURA 8A (CONTINUACIÓN)

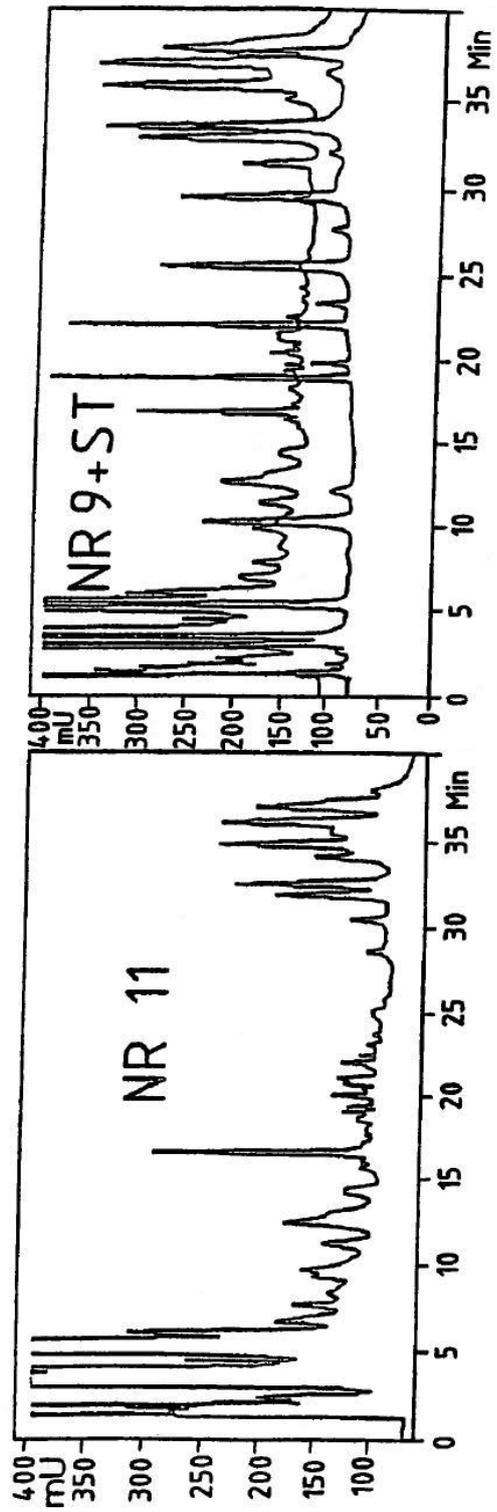


FIGURA 8A (CONTINUACIÓN)

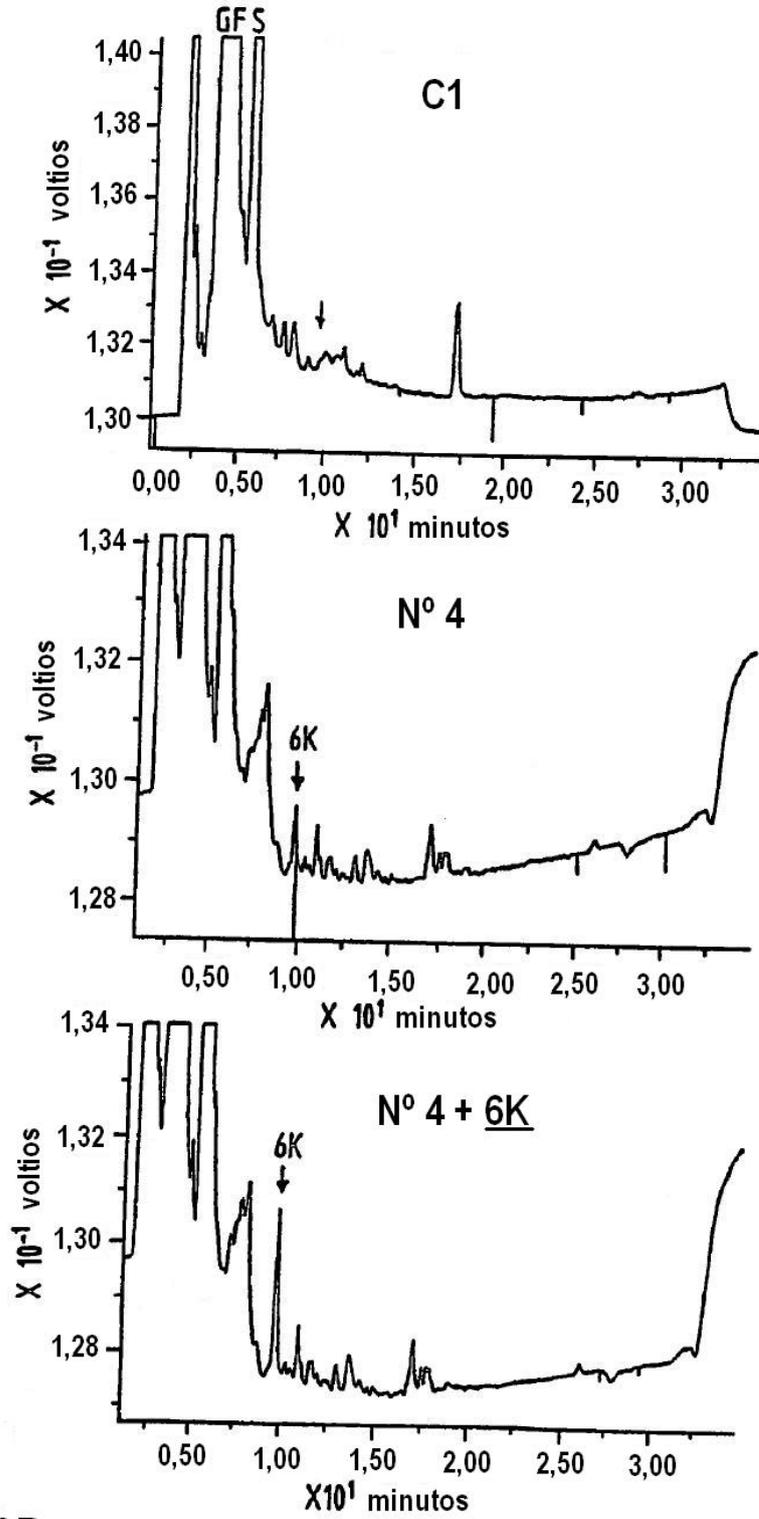


FIGURA 8B