(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 444 947**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C07H 3/00 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2010 E 10722432 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2427565**

(54) Título: **Glucooligosacáridos que comprenden enlaces glicosídicos (alfa 1->4) y (alfa 1->6), su uso, y los métodos para producirlos**

(30) Prioridad:

08.05.2009 EP 09159825
27.05.2009 US 181315 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2014

(73) Titular/es:

RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN (100.0%)
Broerstraat 5
9712 CP Groningen, NL

(72) Inventor/es:

DIJKHUIZEN, LUBBERT;
VAN DER MAAREL, MARC JOS ELISE CORNELIS;
KAMERLING, JOHANNIS PAULUS;
LEEMHUIS, REINDER JOHANNES;
KRALJ, SLAVKO y
DOBRUCHOWSKA, JUSTYNA MALGORZATA

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 444 947 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

Glucooligosacáridos que comprenden enlaces glicosídicos (alfa 1->4) y (alfa 1->6), su uso, y los métodos para producirlos

La invención se refiere al campo de los poli y oligosacáridos y sus efectos nutritivos. En particular, se refiere a la aplicación de α-glucanotransferasas en métodos para preparar fibra alimentaria, incluyendo oligosacáridos prebióticos, y a novedosos oligosacáridos que se pueden obtener a partir del anterior.

El término 'fibra alimentaria' se usó en primer lugar en 1953 por Hipsley para describir los componentes de la pared celular vegetal del alimento. Hoy en día existen muchas definiciones de fibra en uso, pero no existe todavía una definición universalmente aceptada. Generalmente, las fibras se derivan de fuentes de hidratos de carbono que tienen un componente no digerible. Las fibras se dividen normalmente en dos categorías; las fibras insolubles tales como el salvado de trigo, almidón resistente, hemicelulosa, lignina, etc, y las fibras solubles que se pueden clasificar adicionalmente en dos subdivisiones: fibras solubles de longitud de cadena corta, incluyendo polidextrosa, inulina y oligosacáridos, y fibras solubles de longitud de cadena larga que incluyen pectinas, gomas (guar, goma garrofín, carragenato, xantana) y β-glucano (de avena o cebada, por ejemplo)

Las fibras alimentarias son prebióticos, ya que no se pueden digerir por enzimas humanas pero si pueden fermentarse por la flora del intestino grueso. De esta manera, aumentan la biomasa y la frecuencia de defecación, teniendo de esta manera un efecto positivo sobre el estreñimiento y sobre la salud de la mucosa del intestino grueso. Los hidratos de carbono prebióticos se producen naturalmente y se pueden encontrar en numerosos alimentos, incluyendo, espárragos, achicoria, tomates y trigo, así como siendo un componente natural de la leche humana.

El término prebiótico fue definido por Gibson y Roberfroid en 1995. Sin embargo, la definición inicial demostró ser difícil de verificar y desde entonces los autores han desarrollado adicionalmente el concepto proponiendo una nueva definición: "un prebiótico es un ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos en la composición y/o actividad en la microflora gastrointestinal que confieren beneficio al bienestar y la salud del hospedador" (Nutr Res Rev 2004; 17: 259-275). Para que un ingrediente se pueda clasificar como prebiótico, se requiere por tanto que el ingrediente (i) resista la digestión (acidez gástrica, hidrólisis por las enzimas de los mamíferos y absorción gastrointestinal; (ii) sea fermentado por la microbiota intestinal, y (iii) estimule selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar. El último criterio es la principal característica distintiva entre una fibra alimentaria y un prebiótico. Los prebióticos se reconocen generalmente por su capacidad para alterar la microbiota colónica promoviendo una composición y/o actividad más saludable aumentando la prevalencia de microorganismos sacarolíticos (que fermentan los hidratos de carbono) a la vez que reducen los microorganismos de la putrefacción (que fermentan las proteínas).

Los hidratos de carbono no digeribles establecidos que cumplen los criterios prebióticos incluyen fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), lactulosa, inulina y polidextrosa.

La polidextrosa es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa reticuladas aleatoriamente con todos los tipos de uniones glicosídicas. La polidextrosa Litesse es resistente a la digestión debido a su disposición única de enlaces glicosídicos. Molecularmente, predominan los enlaces (α1→6), pero aproximadamente un 13% del polímero tiene enlaces (α1→4), que se pueden hidrolizar por enzimas en el intestino delgado humano. Se fermenta en la totalidad del colon y es particularmente eficaz en la mediación de un efecto probiótico en el colon distal. Los estudios de intervención en seres humanos han demostrado que la polidextrosa Litesse potencia las bifidobacterias y los Lactobacillus en una manera dependiente de la dosis.

El almidón es un polisacárido que se encuentra comúnmente en plantas verdes – aquellas que contienen clorofila – como medio de almacenamiento de energía. El almidón forma parte integral del mercado de millones de ingredientes alimenticios y se caracteriza por su naturaleza compleja y consolidada. El almidón es un ejemplo ideal de un producto básico esencial con una amplia gama de aplicaciones industriales, que incluye la fabricación de papel y cartón, la fermentación, los biocombustibles, los plásticos y detergentes biodegradables, los biopesticidas, tensioactivos, poliuretanos, resinas, aglutinantes y disolventes. Sin embargo, es la industria alimenticia la que proporciona el mercado más grande para el almidón y sus derivados.

El almidón se degrada de forma completa bien en el intestino delgado a glucosa y se captura en la sangre o bien aquellas partes que escapan a la digestión finalizan en el intestino grueso, donde sirven como sustrato general para la flora microbiana colónica. El almidón y sus derivados por sí mismos no estimulan microorganismos colónicos beneficiosos específicos. Por tanto, el almidón por sí mismo no es un compuesto prebiótico. La solución parcial al problema es degradar el almidón al disacárido maltosa y a continuación usar una enzima transglucosidasa para convertir la maltosa en isomaltooligosacáridos (α1→6) unidos (IMO) con un grado de polimerización de 2 a 4. Estos productos IMO son, sin embargo, demasiado cortos y la mayor parte de las veces se degradan en el intestino delgado, no alcanzando de esta manera el colon. La parte del producto IMO que alcanza el colon se degrada rápidamente en la parte proximal del colon por la microflora intestinal y no alcanza la parte distal donde residen las

bacterias más malignas que degradan las proteínas. Para eliminar la competencia de estas bacterias malignas estimulando las especies beneficiosas, en particular las bifidobacterias, se requieren isomaltooligosacáridos más largos.

Anteriormente, se han desarrollado diversos métodos para la modificación química de los maltooligosacáridos (MOS) y el almidón (amilosa, amilopectina). De forma más reciente, se han usado también diversas enzimas transglicosilasas (ciclodextrina glucanotransferasas, amilomaltasas, enzima ramificadora del almidón) para la modificación del almidón (amilosa, amilopectina).

La presente invención proporciona medios y métodos adicionales para la modificación (enzimática) del almidón, derivados del almidón y/o MOS de diferente longitud de cadena a fin de cambiar sus propiedades funcionales y potenciar su valor nutritivo.

Se ha encontrado de forma sorprendente que estos objetivos se pueden cumplir mediante el uso de una α-glucanotransferasa del tipo GTFB de las glucansacarasas, miembro de la familia GH70 de las glicósido hidrolasas [http://www.cazy.org]. Aunque las enzimas glucansacarasas catalizan la conversión de la sacarosa en poli y oligosacáridos de α-glucano, se ha notificado anteriormente que GTFB no reacciona en forma alguna con la sacarosa (Kralj 2004). Se describe en el presente documento que GTFB presenta una elevada actividad hacia los glucooligosacáridos que comprenden restos glucosa (α1→4) unidos, tales como maltooligosacáridos (MOS). GTFB cataliza una reacción de tipo desproporcionante, acortando una molécula de sustrato y alargando una segunda molécula de sustrato. Ambos productos pueden ser de nuevo sustratos en la siguiente reacción. La actividad de GTFB puede dar de esta manera como resultado una serie de glucooligosacáridos lineales de hasta al menos DP35. El análisis estructural de los productos ha revelado que GTFB escinde los enlaces glucosídicos (α1→4) y establece nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6). Es el primer ejemplo de una enzima con esta especificidad de reacción y producto. De acuerdo con esto, esta enzima se designa como (1→4)-α-D-glucano: (1→4) (1→6)-α-D-glucano α-D-glucanotransferasa o, de forma alternativa, como α-glucanotransferasa. Las enzimas glucansacarasas utilizan también MOS, pero solo como sustratos aceptores en presencia de sacarosa como sustrato donante. Esto da como resultado la síntesis de una gama de oligosacáridos, por ejemplo, una malosa extendida con una serie de unidades de glucosa unidas mediante enlaces (α1→6) en el caso de la destransacarasa. En el caso de las glucansacarasas, sin embargo los enlaces (α1→4) de los sustratos MOS no se escinden y MOS solo se usa como sustrato aceptor. Esta es una diferencia principal con la enzima GFTB que fracasa en actuar sobre la sacarosa y usa en su lugar esta MOS como sustrato donante y aceptor, escindiendo los enlaces (α1→4) e introduciendo mediante una reacción de tipo desproporcionante nuevos enlaces (α1→6) y (α1→4). Los productos que GTFB puede sintetizar a partir de almidón o de derivados de almidón contienen cadenas secundarias de isomaltooligosacáridos relativamente largos (IMO), en particular, cadenas secundarias de IMO con un grado de polimerización de 4 y mayor. Parte de la IMO-maltodextrina (IMO-MALT) se degrada en el intestino delgado, pero menos de la que se degradaría cuando se consumen los derivados de almidón no modificados. Esto se debe a que aquellas partes de la maltodextrina que están cercanas a la parte de IMO no se degradarán por las amilasas intestinales, debido a que las amilasas necesitan una determinada longitud de restos glucosa (α1→4) lineales para actuar. IMO-MALT puede por tanto considerarse como un derivado de almidón parcialmente resistente que proporciona menos producción de glucosa en el intestino delgado que la que podría proporcionar la maltodextrina no modificada. Esto se considera beneficioso y contribuye a un estilo de vida sano (reduce el riesgo de desarrollo de obesidad, diabetes de tipo II, y enfermedades del corazón y coronarias relacionadas con el consumo en exceso de derivados de almidón que se degradan rápidamente). La parte de IMO-MALT que pasa sin modificar al colon se degradará adicionalmente por la microflora residual. La parte de IMO de IMO-MALT que contiene enlaces (α1→6) puede actuar como un sustrato específico para las bifidobacterias beneficiosas, haciendo de IMO-MALT un ingrediente prebiótico. IMO-MALT, por tanto, tiene al menos los siguientes beneficios:

1. la maltodextrina/almidón parcialmente resistente, que proporciona menos producción de glucosa y contribuye por tanto a la prevención de la obesidad y a la diabetes de tipo II
2. efecto prebiótico que estimula bifidobacterias intestinales beneficiosas y promueve por tanto la salud del intestino

En una primera realización, la invención se refiere a un método para producir una mezcla de glucooligosacáridos que tiene dos o más enlaces (α1→6) y dos o más enlaces (α1→4) glucosídicos, que comprende poner en contacto un sustrato de poli y/u oligosacáridos que comprenden en su extremo no reductor al menos dos unidades de D-glucosa (α1→4) unidas a una enzima 〈α-glucanotransferasa capaz de escindir enlaces (α1→4) glucosídicos y formar nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos y donde dicha α-glucanotransferasa es un tipo GTFB de enzima o uno de sus homólogos funcionales que tiene la actividad enzimática especificada. De forma alternativa, o, adicionalmente, la α-glucanotransferasa es capaz de transferir una unidad una unidad de maltosilo, una unidad de maltotriosilo o una unidad de maltotetraosilo al sustrato mediante un nuevo enlace (α1→6) glucosídico.

Es ventajoso, especialmente para su aplicación como fibra alimentaria, que el(los) producto(s) de glucooligosacáridos sean lineales o contengan tramos/restos lineales principalmente de enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos, que los vuelven resistentes al ataque enzimático en el intestino delgado. De acuerdo con esto, la α-glucanotransferasa no introduce preferentemente puntos de ramificación (α1→6), ni enlaces (α1→2) ni (α1→3).

En un aspecto específico, la α-glucanotransferasa (GTFB) es un nuevo miembro de la familia GH70 de las glucansacarasas [http://www.cazy.org], o uno de sus homólogos funcionales que tiene preferencia por la actividad y el sustrato enzimático especificados tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, la enzima se selecciona entre la que se muestra en la Tabla 2 o a partir de un grupo que consiste en GTFB procedente de *Lactobacillus reuteri* 121, GTF106B procedente de *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106, GTML4 procedente de *Lactobacillus reuteri* ML1 y GTFDSM procedente de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^{A}, GTF procedente de *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, todas las cuales se conocen en la técnica en el nivel de proteínas y de ácido nucleico. Véanse en particular la Figura 2 y la Tabla 2 siguientes del presente documento para los números de acceso. Por supuesto, se pueden usar también homólogos naturales o artificiales (mutantes) de estas secuencias conocidas, incluyendo variantes diseñadas mediante ingeniería genética que presentan propiedades deseables con respecto a la estabilidad térmica, especificidad por el sustrato, actividad enzimática y similar. En una realización, se usa un homólogo de GTFB que muestra al menos un 55%, preferentemente al menos un 60%, 75%, de forma similar al menos un 80%, 85%, o al menos un 90% de identidad de la secuencias al nivel de los aminoácidos con GTFB procedentes de las enzimas (análogas) a GTB relacionadas en la Tabla 2, o, preferentemente, con *Lactobacillus reuteri* 121 (AAU08014), GTF106B procedente de *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 (ABP88725), GTML4 procedente de *Lactobacillus reuteri* ML1 (AAU08003), GTFDSM procedente de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^{A} (ABQ83597) o GTF procedente de *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 (ZP_03945763). Por ejemplo, se utiliza un homólogo de GTFB que presenta al menos un 55%, preferentemente al menos un 60%, 75%, de forma similar al menos un 80%, 85%, o al menos un 90%, de identidad de la secuencia en los aminoácidos con GTFB procedente de *Lactobacillus reuteri* 121.

Se prefiere que la enzima presente al menor un 45%, de forma más preferente al menos un 50% de identidad de la secuencia o al menos un 60% de identidad de la secuencia en los aminoácidos con el núcleo catalítico de GTFB, representándose el núcleo catalítico por la secuencia de aminoácidos contigua W^{790}YRP....IVMNQ^{1484} como se encuentra en la secuencia de proteínas de GFTB de *L. reuteri* 121: número de acceso al GenBank AAU08014 (código de la proteína).

El homólogo de GTFB comprende preferentemente uno o más de los siguientes restos de aminoácidos conservados, donde la numeración corresponde a la posición en GTFB de *Lactobacillus reuteri* 121: Arg1013; Asp1015; Ala1017; Asn1019; Glu1053, Gly1054, Tyr1055, His1124, Asp1125, Gln1126, Arg1127, Lys1128, Asp1479; Ile1480, Met1482, Asn1483, Gln1484. Preferentemente, al menos están presentes los restos catalíticos Asp1015, Glu1053 y Asp1125. De forma más preferente, están presentes todos estos restos.

Se han identificado cuatro regiones conservadas en el dominio catalítico de las enzimas GTF. Los estudios de ingeniería de proteínas anteriores han demostrado que los restos de aminoácidos localizados en la región III y IV de la secuencia conservada (véase la Figura 1 para una alineación de la secuencia) para controlar la especificidad del producto de las enzimas GTF con respecto al tipo de enlace glucosídico formado (Hellmuth y col. Biochemistry (2008); Kralj y col. (2005) Biochemistry 44, 9206-9216; Kralj y col. (2006) FEBS J. 273, 3735-3742). También, la región I y la región II contienen restos de aminoácidos que contribuyen a la actividad de la enzima y a la especificidad de la reacción [Kralj y col. (2005); Swistowska y col. (2007) FEBS Lett. 581, 4036-4042.]. En un aspecto específico, la enzima comprende al menos una de las siguientes secuencias consenso donde la numeración corresponde a la posición de los aminoácidos en GTFB (véase la Figura 1):

A) (región conservada II): F^{1009}DGFRVDAADNIDADVLDQ^{1027}
B) (región conservada III): H^{1048}L(S/V)YNEGYHSGAA^{1060}
C) (región conservada IV): W^{1118}SFVTNHDQRKN(L/V)I^{1131}
D) (región conservada I): G^{1473}LKVQED(I/L)VMNQ^{1484}

En una realización, la enzima es un miembro de GTFA procedente del grupo de las glucansacarasas, por ejemplo GTFA procedente de *Lactobacillus reuteri* (número de acceso al GenBank AX306822 o AY697435 (secuencia de GTF + secuencias flanqueantes a.o. GTFB + transposasas), que se ha diseñado mediante ingeniería genética para obtener la especificidad y actividad de sustrato “análoga a GTFB” únicas necesarias para llevar a la práctica la presente invención. La invención se refiere también de esta manera a la enzima modificada genéticamente que pertenece al tipo GTFA de las enzimas glucansacarasas que comprenden al menos dos de las mutaciones de la Tabla 1, siendo capaz dicha enzima de escindir los enlaces (α1→4) glucosídicos y constituir nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos y de tener una preferencia del sustrato por los sustratos poli y/u oligosacáridos que comprenden unidades de D-glucosa (α1→4) unidas, en particular maltooligosacáridos. Las personas expertas comprenderán que se pueden introducir mutaciones equivalentes a las mencionadas en la Tabla 1 en los homólogos de la enzima GTFA procedentes de otros organismos. Por ejemplo, GTF180 procedente de *Lactobacillus reuteri* 180, GTFML1 procedente de *Lactobacillus reuteri* ML1, DSRS procedente de *Leuconostoc mesenteroides* B512-F, GTFD procedente de *Streptococcus mutans* GS-5 (véase también van Hijum y col. 2006).

Tabla 1: mutaciones para introducir la actividad análoga a GTFB (a-glucotransferasa) en una enzima de tipo GTFA (glucansacarasa)

Posición nº	**Mutación***	**Posición nº**	**Mutación***
981	L → V	1136	S eliminada
1026	P → A	1134-1136	NNS → QR
1062	D → G	1137	Q → K
1063	W → Y	1414	N → L
1064	N → H	1463	D → R, T o M
1062-1064	DWN → GYH	1510	W → I o L
1134	N → Q	1512	P → M
1135	N → R	1513	D → N
nº de la numeración correspondiente a Lactobacillus reuteri 121 GTFA * código del aminoácido de una sola letra			

Se proporciona también el uso de una enzima capaz de escindir los enlaces (α1→4) glucosídicos y de realizar nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos, y/o transferir una unidad de maltosilo, una unidad de maltotriosilo o una unidad de maltotetraosilo realizando un nuevo enlace (α1→6) glucosídico, en un método para producir derivados de almidón, preferentemente, derivados de almidón (parcialmente) indigeribles donde estos derivados se definen como en la Reivindicación 20. La enzima es un tipo GTFB de glucansacarasa, seleccionado, por ejemplo, a partir de la Tabla 2, o del grupo que consiste en GTFB procedente de *Lactobacillus reuteri* 121, GTF106B procedente de *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106, GTML4 procedente de *Lactobacillus reuteri* ML1, GTFDSM procedente de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016[A] o GTF procedente de *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, o uno de sus homólogos naturales o artificiales (mutante). Preferentemente, la enzima es GTFB procedente de *Lactobacillus reuteri* 121.
La persona experta en la técnica será capaz de determinar las condiciones de proceso adecuadas para llevar a cabo un método tal como se proporciona en el presente documento mediante experimentación rutinaria, tal como temperatura, tiempo de incubación, pH, cantidad de enzima, etc. Se puede usar un intervalo de pH de 4-5, preferentemente 4-4,5. En una realización, se usa una temperatura de al menos 20º C, preferentemente 37º C. En otra realización, por ejemplo, a la vista de las propiedades del sustrato y/o la esterilidad, puede ser deseable trabajar a una temperatura más elevada, similar al menos a 70º C, con la condición de que la enzima sea suficientemente estable al calor. El contenido de materia seca de la mezcla de reacción puede variar. En una realización, es al menos del 10%, preferentemente al menos del 25%.

Se pueden usar diversos oligosacáridos o sustratos de glucano o mezclas de sustratos en un método de acuerdo con la invención, con la condición de que comprendan poli y/u oligosacáridos cuyos extremos no reductores contengan restos de glucosa (α1→4) unidos. Preferentemente, dichos extremos no reductores contienen 3 o más restos de glucosa (α1→4) unidos consecutivos. Se prefieren los sustratos lineales. De acuerdo con esto, se proporciona también un método para producir una mezcla de glucooligosacáridos lineales que tienen dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos y dos o más enlaces (α1→4) glucosídicos, que comprende poner en contacto, por ejemplo, mediante incubación, un sustrato de poli y/u oligosacáridos lineales que comprende en su extremo reductor al menos dos unidades de D-glucosa unidas (α1→4) con una enzima α-glucanotransferasa capaz de escindir enlaces (α1→4) glucosídicos y realizar nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos.

Se observan muy buenos resultados cuando el sustrato tiene un grado de polimerización de al menos 4, preferentemente al menos 5, de forma más preferente al menos 6. El sustrato se selecciona, por ejemplo a partir del grupo que consiste almidón natural, almidón modificado, derivados de almidón, maltooligosacáridos, amilosa, amilopectina, maltodextrinas, (α1→4) glucanos, reuteran, o sus combinaciones. El término “derivado de almidón” tal como se usa en el presente documento se refiere al producto de almidón natural que ha experimentado una o más modificaciones, ya sea por medios físicos y/o bioquímicos. Las modificaciones incluyen despolimerización, reticulación y sustitución. El almidón o el derivado de almidón pueden originarse a partir de diversas fuentes vegetales, que incluyen patata, maíz, tapioca o trigo. Algunas de las otras materias primas incluyen, arroz, mandioca, maranta, judía mungo, guisantes, cebada, avenas, trigo sarraceno, banana, sorgo y lentejas. Se prefiere el almidón (derivado) de patata, maíz, tapioca o trigo.

En un aspecto específico, un método de la invención usa almidón tratado con amilomaltasa (Amasa) (ATA), preferentemente almidón de patata, como sustrato. ATS está comercialmente disponible de AVEBE (Veendam The Netherlands) con el nombre comercial Etenia™. Una realización específica adicional emplea reuteran como sustrato, que es un producto de α-glucano de la actividad reuteransacarasa y comprende enlaces (α1→4) y (α1→6). También, una mezcla de reuteran y maltooligosacáridos (MOS) proporciona muy buenos resultados. Se proporciona también el tratamiento de un producto obtenible mediante la incubación del almidón, un derivado de almidón, maltodextrina o maltooligosacárido tal como alfa-amilasa, beta-amilasa, alfa-glucosidasa, o amilasa maltogénica. Esto proporciona una fibra de oligosacárido lenta o no digerible.

Como se ilustra más adelante en el presente documento, un método de la invención tal como se ha descrito anteriormente dará como resultado normalmente una mezcla de diversos glucooligosacáridos lineales que tienen dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos consecutivos y dos o más, preferentemente más, enlaces (α1→4) glucosídicos consecutivos. Para muchas aplicaciones industriales (por ejemplo, nutritivas), la mezcla puede usarse esencialmente como tal y no requiere purificación adicional. Sin embargo, si se desea, es posible por supuesto aislar o eliminar uno o más glucooligosacáridos individuales de la mezcla. A este fin, se pueden usar diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas de precipitación-fraccionamiento o técnicas de cromatografía. En una realización, un método de la invención comprende someter la mezcla a cromatografía de intercambio aniónico y/o exclusión por tamaño y aislar al menos un glucooligosacárido que tenga dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos y dos o más, preferentemente más enlaces (α1→4) glucosídicos.

Como se indica, una actividad enzimática tal como se describe en el presente documento puede proporcionar un oligosacárido con una única estructura, Se proporciona un glucooligosacárido lineal (es decir, no ramificado) de fórmula general A-B, un glucano que comprende el mencionado resto lineal o una mezcla que comprende diferentes restos de glucoligosacáridos de fórmula general A-B, donde el enlace entre el resto A y el resto B es un enlace (α1→6) glucosídico y donde B comprende al menos dos, preferentemente al menos tres restos de glucosa (α1→4) unidos. Preferentemente solo están presentes enlaces (α1→6) y (α1→4) glucosídicos. El resto lineal de fórmula general A-B se puede unir a cualquier tipo de glucano (ya sea ramificado o no ramificado), por ejemplo, amilopectina cérea.

En una realización, el glucooligosacárido lineal (es decir, no ramificado) de fórmula general A-B, o la mezcla que comprende diferentes glucooligosacáridos de la formula general A-B, caracterizada por que (i) el enlace entre el resto A y el resto B es un enlace (α1→6) glucosídico, (ii) el resto A comprende dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos consecutivos, preferentemente donde A comprende un isomaltooligosacárido con un grado de polimerización de al menos 4 restos de glucosa y (iii) comprende al menos dos, preferentemente al menos tres restos de glucosa (α1→4) unidos consecutivos. Por ejemplo, el resto A consiste en una serie de restos de glucosa unidos (α1→6) consecutivos y el resto B consiste en una serie de restos de glucosa (α1→4) unidos consecutivos.

En otra realización, el resto A comprende dos o más enlaces (α1→4) glucosídicos, preferentemente donde A comprende un maltooligosacárido con al menos cuatro restos de glucosa (α1→4) unidos. De esta manera, un tramo de los restos (α1→4) unidos se puede unir mediante un enlace (α1→6) a otro tramo de restos (α1→4) unidos.

Se proporcionan oligosacáridos de longitudes de cadena variables. En una realización, el glucooligosacárido (resto) tiene un grado de polimerización (DP) de al menos 7 (DP≥7), preferentemente al menos 10 (DP≥10), de forma más preferente al menos 15, hasta aproximadamente 50. Se han observado oligosacáridos con una longitud de hasta más de 30 restos de acuerdo con el análisis MALDI-TOF-MS, Normalmente, la cantidad relativa de los productos DP10-DP35 con una masa molecular elevada en una mezcla es de menos de la cantidad de productos DP<10. Una mezcla a modo de ejemplo tiene un grado promedio de polimerización de al menos 5, preferentemente al menos 6, tal como entre 6 y 15.

Cuando se usan maltooligosacáridos (por ejemplo DP7, o DP6) como sustratos, se producen una serie de glucooligosacáridos lineales, y se observan a menudo estructuras diferentes de un DP dado. Por ejemplo, se identificaron al menos 4 estructuras DP8, difiriendo cada una con respecto al número de enlaces (α1→6) y (α1→4) glucosídicos. Véase también la Figura 6. Hablando también de manera general, la relación de enlaces (α1→6) a (α1→4) glucosídicos y la diversidad estructural aumenta con el aumento de la longitud de la cadena.

En un aspecto, al menos un 20%, preferentemente al menos un 25%, de los enlaces es (α1→6). La relación entre los enlaces (α1→6) and (α1→4) glucosídicos varía entre 20:80 y 90:10. Por ejemplo, se proporciona un producto DP7 lineal con dos enlaces (α1→6) consecutivos y cuatro enlaces (α1→4) consecutivos; el producto DP8 lineal con dos enlaces (α1→6) consecutivos y cinco enlaces (α1→4) consecutivos; o un DP8 con tres enlaces (α1→6) consecutivos y cuatro enlaces (α1→4) consecutivos; un DP9 con cinco con cinco enlaces (α1→6) consecutivos y tres enlaces (α1→4) consecutivos; un DP9 con cuatro enlaces (α1→6) consecutivos y cuatro enlaces (α1→4) consecutivos, un DP10 con cinco enlaces (α1→6) consecutivos y cuatro enlaces (α1→4) consecutivos (véase la Figura 6).

Para su aplicación como ingrediente nutritivo que proporciona al consumidor tanto una fibra prebiótica como una fuente de energía, el oligosacárido (mezcla) comprende preferentemente cantidades sustanciales de enlaces (α1→6) y (α1→4) glucosídicos. Por tanto, en una realización, la relación entre los enlaces (α1→6) y (α1→4) glucosídicos es entre 30:70 y 70:30.

Una mezcla de oligosacáridos o glucooligosacáridos de acuerdo con la invención tiene importantes aplicaciones industriales en las composiciones nutritivas y alimenticias. Se proporciona un producto alimenticio (humano o animal) que comprende un glucooligosacárido o glucooligosacárido (muestra) de acuerdo con la invención. El producto alimenticio puede ser un producto alimenticio sólido, semisólido o líquido. El producto alimenticio puede ser un producto nutritivo convencional o un producto dietético. Puede ser un producto alimenticio listo para comer o un producto alimenticio que requiera una manipulación adicional antes del consumo, análogo a un producto de

panadería precocido. Los productos a modo de ejemplo incluyen un producto lácteo, con una fórmula para bebé o infantil, un producto de panadería, producto de pasta, producto de fideos, producto de pastelería, bebida líquida, bebida deportiva, bebida y helado.

Una realización adicional se refiere al uso de un glucooligosacárido o una mezcla de glucooligosacáridos de acuerdo con la invención como aditivo alimentario, por ejemplo como fibra prebiótica. Se pueden usar prebióticos en múltiples aplicaciones alimentarias desde aplicaciones de lácteos a panadería, aplicaciones de pastelería y bebidas. Debido a su estructura química y física tienden a ser muy solubles y tienen la capacidad de mejorar la sensación corporal, en la textura, y en la boca.

Otra aplicación útil se refiere a la inhibición de enzimas del tipo alfa-amilasa, tales como amilasas salivales o pancreáticas. Estas enzimas actúan normalmente sobre una cadena (α1→4) de maltooligosacárido con un DP que varía desde 4-6. Se ha teorizado que la presencia de enlaces (α1→6) (no hidrolizables) en un oligosacárido de la invención solo da como resultado la unión de una enzima pero no la liberación de glucosa. La adición de dichos oligosacáridos podría disminuir la velocidad del metabolismo de (por ejemplo, el metabolismo del almidón), reduciendo de este modo el índice glucémico (GI) de un producto alimenticio. Un glucooligosacárido (mezcla) de acuerdo con la invención puede por tanto ayudar también a reducir el valor calórico y/o la carga glucémica de los productos alimenticios. Esto contribuye por tanto a una dieta con un GI bajo. Esto es de particular interés para la salud humana en general así como en las enfermedades metabólicas específicas, incluyendo la diabetes mellitus y la obesidad.
En una realización adicional, el glucooligosacárido (mezcla) tiene uso en una aplicación terapéutica o cosmética, en particular para controlar una flora de piel normal y promover una piel sana. El oligosacárido puede propiciar un efecto prebiótico ya que puede utilizarse preferentemente de forma selectiva por bacterias saprofitas. Por ejemplo, el oligosacárido puede promover el crecimiento de bacterias beneficiosas para la piel (por ejemplo, *Micrococcus kristinae*) en comparación con el crecimiento de bacterias menos deseables tales como *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium xerosis*. Se proporciona una composición cosmética que comprende un glucooligosacárido o una mezcla de glucololigosacáridos de acuerdo con la invención y un portador adecuado. Es también posible emplear el glucooligosacárido (mezcla) en un objeto de aseo personal, por ejemplo, para incluir un artículo absorbente tal como un pañal desechable, una compresa higiénica, o similar que puede reducir el olor y la dermatitis (prurito) generados cuando dicho artículo absorbente se gasta.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Alineación de la secuencia de aminoácidos [http://www.cazy.org] de las regiones conservadas (II, III, IV y I) y los dominios catalíticos de (A) (posibles) enzimas α-glucanotransferasas (B) DSRE y DSRP, enzimas glucansacarasas que contienen dos dominios catalíticos (CD1 y CD2) y (C) y enzimas dextran, mutan, alternan y reuteransacarasas de bacterias del ácido láctico. Los siete restos de aminoácidos estrictamente conservados (1-7), que tienen importantes contribuciones a los subsitios -1 y +1 en las enzimas glucansacarasas se conservan también en las enzimas α-glucanotransferasas (que se muestran subrayadas y en la escala de grises para GTFA y GTFB de *L. reuteri* 121) la numeración de los aminoácidos (cursivas) es de acuerdo con GTF180 de *L. reuteri* 180. El aminoácido D1015 de GTFB (posible resto nucleófilo) se muestra en tipo negrita.

Figura 2. Árbol filogenético de proteínas análogas a GTFB derivadas del análisis ahilogenético de las secuencias de 70 proteínas de la familia de las glucósido hidrolasas 108 disponibles en la base de datos Pfam. Véase la tabla 2 anterior para más detalles sobre las secuencias en esta agrupación

Figura 3. Análisis TLC de los productos de reacción de GTFB 90 nM incubado durante 13 h en tampón de NaAc 50 mM pH 4,7, $CaCl_2$ 1 mM con sacarosa 25 mM o maltooligosacáridos 25 mM. St = estándar, Suc, sacarosa; G1, glucosa; G2, maltosa; G3, maltotriosa; G4, maltotrehaosa; G5, maltopentaosa; G6, maltohexaosa; maltoheptaosa; Pol, polímero

Figura 4. Análisis Dionex de los productos de reacción de GTFB 90 nM incubado para cualquiera de 0, 1, 2 u 8 h en tampón NaAc 50 mM pH 4,7, $CaCl_2$ 1 mM con A) maltohexaosa 25 mM o B) maltoheptaosa 25 mM.

Figura 5. Análisis Dionex de muestras de sustrato incubadas sin enzima (paneles A) o con GTFB 90 nM (paneles B) incubadas durante a 37º C en NaAc 25 mM pH 4,7, $CaCl_2$ 1 mM con amilosa-V al 0,25% (abreviada a AMV) sola o como sustrato donante y amilosa-V con glucosa 15 mM (G1) o maltosa 25 mM (G2) como sustratos aceptores.

Figura 6. Representación esquemática de los diversos α-glucanos en la mezcla del producto de la incubación del maltooligosacárido DP7 con actividad (análoga) a GTFB.

Figura 7. Espectro de RMN ^{1}H de la mezcla del producto tras la incubación del maltooligosacárido DP7 (100 mM) con GTFB (250 mM) durante 120 h.

Figura 8. Modo posible de acción de GTFB. Representación esquemática de las secuencias de reacción que se

producen en el sitio activo del tipo GTFB de enzimas. Los subsitios donante y (aceptor) del tipo de enzimas GTFB se cartografían basándose en la información estructural 3D disponible de las enzimas glucansacarasas (con un subsitio donante (-1) y los datos obtenidos en el presente estudio. La unión de G7 a los subsitios -1 y +1 a +6 da como resultado la escisión del enlace α-1,4 glucosídico (G6 liberado, se muestra en gris) y la formación de un (posible) **intermedio covalente** en el subsitio -1 (indicado con una línea gris). Dependiendo del sustrato aceptor utilizado, la **hidrólisis** (con agua) o la transferencia del glicosilo con un oligosacárido aceptor (véase a continuación). La enzima GTFB procedente de *Lb. Reuteri* 121 cataliza también una reacción de **desproporcionación** con maltooligosacáridos. Dos moléculas de maltoheptaosa (G7) por ejemplo, se conviertes en una molécula G6 y en un producto G8 que contiene 8 restos de glucosa pero con un enlace α-1,6 glucosídico sintetizado recientemente en el extremo no reductor.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Introducción

Las enzimas glucansacarasas (GS) (o glucosiltransferasas; GTF) (EC 2.4.2.5) de las bacterias del ácido láctico (LAB) utilizan sacarosa para sintetizar una diversidad de α-glucanos con enlaces (α1→6) glucosídicos [dextran, que se encuentra principalmente en *Leuconostoc*], (α1→3) [mutan, que se encuentra principalmente en *Streptococcus*], de forma alternativa (α1→3) y (α1→6) [alternan, notificado solo en *Leuconostoc mesenteroides*], (α1→4) [reuteran, por GTFA y GTFO procedente de cepas de *Lactobacillus reuteri*] {Monchois, 1999; van Hijum, 2006; Arguello-Morales, 2000 ;Kralj, 2002 ;Kralj, 2005 }.

Lactobacillus reuteri 121 utiliza glucansacarasa GTFA y la sacarosa como sustrato para sintetizar un producto de reuteran con grandes cantidades de enlaces (α1→4) glucosídicos. En la dirección 5' de este gen *gtfA* se identificó otro posible gen de la glucansacarasa designado *gtfB.* Anteriormente se ha mostrado que tras la clonación y la expresión de este gen la enzima no mostró actividad sobre la sacarosa como sustrato. En el genoma de *L. reuteri* ML1, también se identificaron el posible dominio catalítico y el domino del extremo C del homólogo de gtfB, gtfML4, en la dirección 5' de gtfML1 que codificaba una mutansacarasa {Kralj, 2004}. En la secuencia del genoma recientemente elucidado de *L. reuteri* DSM 20016 también se pudo identificar un homólogo de GTFB (73% de identidad, 85% de similitud en 883 aminoácidos). Además, también *L. reuteri* TMW1.106 contiene junto con un homólogo de GTFA (GTFA106), un homólogo de GTFB (GTFB106). Esta enzima mostró un 92% de identidad y un 95% de similitud en los 1383 aminoácidos de GTFB procedente de *L. reuteri* 121. Sin embargo, en contraste con GTFB, GTFB106B mostró una baja actividad de hidrolización (después de 27 h de incubación) sobre la sacarosa {Kaditzky, 2008}.

Se demuestra en el presente documento que GTFB tiene una actividad de tipo desproporcionación y de tipo polimerización sobre los maltooligosacáridos. La enzima utiliza maltooligosacáridos (que contienen solo enlaces (α1→4) glucosídicos) como sustrato para sintetizar oligosacáridos hasta un grado de polimerización (DP) de 35. Durante este proceso de polimerización con alargamiento se introdujeron grandes cantidades de enlaces (α1→6) glucosídicos (~ 32%) en el producto final. Además, los inventores han demostrado que con un sustrato de amilosa grande (Amilosa-V) como donante y sacáridos más pequeños (glucosa, maltosa) como aceptor, se sintetizan también sacáridos más grandes unidos mediante enlaces (α1→4) glucosídicos que contienen más de cinco unidades de glucosa. El análisis detallado del producto sintetizado a partir de la maltoheptaosa mediante análisis de metilaciones y RMN ^{1}H demostró que se introdujeron hasta un 32% de enlaces (α1→6) glucosídicos en el producto final. Aunque la estructura primaria de GTFB es similar a la de las enzimas GH70, incluyendo el cilindro permutado $(\beta/\alpha)_8$, su actividad se asemeja más al tipo de enzimas GH13 de la α-amilasa, que utilizan maltooligosacáridos como sustrato preferido.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, plásmidos, medios y condiciones de crecimiento. Se utilizó *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) como hospedador para fines de clonación. Se utilizaron los plásmidos pET15b (Novagen, Madison, WI) para la expresión de los genes *gtfB* (mutantes) en *E. coli* BL21 Star (DE3). (Invitrogen). Se hicieron crecer cepas de *E. coli* de forma aerobia a 37º C en medio LB (Ausubel, 1987). Se cultivaron cepas de *E. coli* que contenían plásmidos recombinantes en medio LB con 100 μg ml^{-1} de ampicilina. Se prepararon placas de agar añadiendo agar al 1,5% al medio LB

Alineación de la secuencia de aminoácidos de GTFB procedente de *L. reuteri.* Se prepararon múltiples alineaciones de secuencias de aminoácidos de GTFB y glucansacarasas conocidas y posibles α-glucanotransferasas procedentes de bacterias acidolácticas con la interfaz ClustalW en la versión 4 de MEGA (www.megasoftware. net) con aperturas de hueco y penalizaciones por extensión de 10 y 0,2, respectivamente.

Técnicas moleculares. Los procedimientos generales para la clonación de genes, transformaciones del ADN de *E. coli*, manipulaciones del ADN, y electroforesis en gel de agarosa se llevaron a cabo tal como se ha descrito {Sambrook, 1989}. Las digestiones con la endonucleasa de restricción y las ligaduras con la ADN ligasa T4 se llevaron a cabo tal como recomendaban los suministradores de la enzima (New England Biolabs, Beverly, MA;

Roche Biochemicals, Basel, Suiza). Se obtuvieron los cebadores de Eurogentec, Seraing, Bélgica. Se llevó a cabo la secuenciación mediante GATC (Konstanz, Alemania). Se amplificó el ADN mediante la PCR en un ciclador térmico de ADN PTC-200 (MJ Research, Waltham, Massachusetts) utilizando ADN polimerasa *Pwo* (Roche Biochemicals) o polimerasa Expand High Fidelity (Fermentas). Se aisló ADN plásmido de *E. coli* utilizando un kit de extracción de plásmidos Wizard Plus SV (Sigma)

Construcción de plásmidos. Se utilizaron parejas de cebadores y molde de ADN adecuados para crear dos construcciones de expresión diferentes con una etiqueta His en el extremo C para la GTFB completa (1587 aminoácidos), construida utilizando tres reacciones de la PCR independientes utilizando el método anteriormente descrito para GTFA procedente de *Lb. reuteri* 121 (véase a continuación){Kralj, 2002}, y una variante truncada en el extremo N (sin extremo N) de la región variable de GTFB (889 aminoácidos).

Para facilitar futuras mutagénesis y secuenciación de nucleótidos, *gtfB* se dividió y clonó en tres partes. El primero de los dos sitios de restricción *PstI* (1385 pb, 1751 pb) se alteró, utilizando el método del mega cebador {Sarkar, 1990} y los siguientes cebadores: BpstIfor 5'-GTAAGTCGTTACTC**A**GCAGATGCTAATGG-3' que contenían un sitio de restricción *PstI* mutado (subrayado, mutación silenciosa mediante cambio de bases que se muestra en letras negritas), y BpstI rev 5'-GGTCAGTAAATCCACCGTTATTAATTGG-3'. En una reacción de la PCR posterior, se utilizó el producto amplificado (420 pb) como cebador (inverso) junto con Bfor: 5'-GCAATT*GTCGAC***CATGG**ATACAA,XrACTGGTGATCAGCAAACTGAACA-GG-3' que contenía los sitios de restricción *Sal*I (cursiva) y *Nco*I (negrita). El producto resultante de 1700 pb se digirió con *Sal*I y *Pst*I y se ligó en los sitios correspondientes de pBluescript II SK+, dando como resultado pBSP1600. El producto amplificado de 420 pb se utilizó también como un cebador directo junto con BrevBamHI 5'-GGACTGTTATCACTATTATTATTTCCGGCC-3' de 70 pb en la dirección 3' de un sitio de restricción *Bam*HI. El producto resultante de (~ 1500 pb) se digirió con *PstI* y *BamHI* y se ligó en los correspondientes sitios de pBluescript II SK+, dando como resultado pBPB1000. El tercer fragmento se obtuvo utilizando los cebadores BforBamHI 5'-CGCTATGTAATTGAACAGAGTATTGCTGC-3' de 200 pb en la dirección 3' del sitio de restricción *Bam*HI y BRevHis 5'-CCTCCTTT*CT**AGA**TCT*ATTAGTGATGGTGATG GTGATGGTTGGTTAAAGTTTAATG AAATTGCAGTTGG-3'que contenían *Xba*I (negrita) y *Bgl*I (negrita) y una etiqueta de 6x histidina (subrayado). El producto resultante de 2300 pb se digirió con *Bam*HI y *Xba*I y se ligó en los correspondientes sitios de pBluescript II SK+, dando como resultado pBBX2300. Se ensambló el gen completo como sigue: pBPB1000 se digirió con *Pst*I y *Bam*HI y el fragmento resultante se ligó en pBSP1600 restringido con las mismas enzimas de restricción dando como resultado pBSB2600 (que contenía el primer y el segundo fragmento). Posteriormente, el plásmido pBBX2300 se digirió con *Bam*HI y *Sac*II (presentes en el plásmido, utilizados en vez de *Xba*I) y se ligó el fragmento en pBSB2600 dando como resultado pBSS4900 que contenía el gen *gtfB* de longitud completa. Este plásmido se digirió con *Nco*I and *Bgl*II y el gen *gtfB* se ligó en los sitios *Nco*I y *Bam*HI de pET15b, dando como resultado pET15B-GTFB.

Expresión y purificación de GTB. Un cultivo nocturno de *E. coli* BL21star (DE3) que hospedaba GTFB (mutante) {Kralj, 2004} se diluyó 1/100. Se hicieron crecer las células hasta una DO_{600} de 0,4 y se indujeron con IPTG 0,2 mM, después de 4 h de crecimiento, las células se cosecharon mediante centrifugación (10 min a 4º C a 10.000 x g). Las proteínas se extrajeron mediante sonicación y se purificaron mediante Ni-NTA y cromatografía de intercambio aniónico tal como se ha descrito anteriormente para la GTFA (reuteransacarasa) procedente de *Lactobacillus reuteri* 121 {Kralj, 2004}, con la siguiente modificación: para la cromatografía de intercambio aniónico, se utilizó una columna Hi-trap™ Q HP de 1 ml (Ge Healthcare).

(i) pH y temperatura óptimos, se determinaron el pH y la temperatura óptimos, midiendo cualitativamente en TLC la cantidad de oligo y polisacáridos sintetizados a partir de maltotetraosa 25 mM tras incubación durante la noche (no se muestran los datos).

(ii) productos sintetizados a partir de maltooligosacáridos y otros sacáridos. *Incubaciones de sustrato único* Se incubaron GTFB 90 nM y sacarosa 25 mM (Acros), rafinosa (Sigma), turanosa (Sigma), palatinosa (Sigma, panosa (Sigma), Amilosa-V al 0,25% (Avebe, Foxhol, Países Bajos), amilopectina al 0,25%, isomaltopentaosa 25 mM, isomaltohexaosa (Sigma), maltooligosacáridos con un grado diferente de polimerización (G2-G7) por separado durante la noche en NaAc 25 mM pH 4,71 $CaCl_2$ 1 mM a 37º C y se analizaron mediante TLC. Los productos sintetizados a partir de G6 y G7 se analizaron en el tiempo mediante TLC y HPAEC.

Estudios de aceptores / donantes. Se incubaron GTFB 90 nM y glucosa y maltooligosacáridos 25 mM con un grado diferente de polimerización (G2-G7) durante la noche junto con amilosa-V al 0,25% en NaAc 25 mM pH 4,71 $CaCl_2$ mM a 37º C y se analizaron mediante TLC.

(i) Caracterización de los oligosacáridos y polisacáridos producidos a partir de G7. Se incubaron preparaciones de la enzima GTFB purificada (90 nM) durante 7 días con G7 150 mM (Sigma), utilizando las condiciones descritas anteriormente en los ensayos de enzimas. Los oligo y polisacáridos producidos mediante GTFB purificada recombinante se separaron mediante precipitación con etanol al 96% (la mayoría de precipitados de productos sacáridos más grandes) (van Geel-Schutten, 1999)

(ii) Análisis de metilaciones. Se permetilaron oligo y polisacáridos utilizando yoduro de metilo y dimesil sodio (CH_3SOCH_2--Na^+) en DMSO a temperatura ambiente {Kralj, 2004}

RESULTADOS

Alineamiento de GTFB

GTFB es el primer representante de un grupo de enzimas análogas identificadas en diferentes lactobacilos. Los alineamientos de los miembros de este grupo novedosa de enzimas con otras glucansacarasas mostraron similitudes pero también diferencias características. Los tres restos catalíticos presentes (D1024, E1061 y D1133, la numeración de GTFB de *L. reuteri* 121 se ha utilizado en su totalidad salvo que se indique otra cosa) en las glucansacarasas también están presentes en el grupo de las α-glucanotransferasas (numeración de D1015, E1053 y D1125 de GTFB de *L. reuteri* 121). Sin embargo, un importante número de restos de aminoácidos conservados en la región I, II, III y IV de glucansacarasas están ausentes en el grupo de enzimas de la α-glucanotransferasa (Fig. 1). En la región II (que abarca los restos posiblemente nucleófilos) el V1025 conservado (Pro en GTFA y GTFO) está sustituido por alanina en las α-glucanotransferasas. La región III, la región en dirección 3' del posible catalizador ácido/base E1061 es completamente diferente entre las glucansacarasas y las α-glucanotransferasas.
Sin embargo, un número importante de restos de aminoácidos conservados en la región I, II, III y IV de las glucansacarasas están ausentes en el grupo de enzimas α-glucanotransferasa (Fig. 1). En la región II (que abarca los posibles restos nucleófilos) el P1025 conservado (Pro en GTFA y GTFO, Val en la mayoría de GTF) está sustituido por alanina en las α-glucanotransferasas. La región III, la región en dirección 5' del posible catalizador ácido/base E1061 es completamente diferente entre las glucansacarasas y las α-glucanotransferasas. El triptófano 1063 conservado está sustituido por un resto tirosina en las α-glucanotransferasas (Fig. 1). En la región IV, los homólogos de GTFB contienen un hueco inmediatamente en dirección 5' respecto a la ubicación del resto Q1137 y en la posición de la glutamina conservada, se encuentra un resto lisina.

Homólogos de GTFB

La investigación de secuencias de genes y proteínas en los bancos de datos mostró algunas secuencias que podrían tener la misma actividad catalítica que GTFB. La información se basa en un árbol filogenético de los 70 miembros de la familia de la glicósido hidrolasa (108 secuencias disponibles en la base de datos Pfam a fecha 27 de abril de 2010). Análogamente, el árbol filogenético está disponible en el servidor de Pfam, véase la Figura 2.

Tabla 2. 70 secuencias de la familia de la glicósido hidrolasa procedentes de la base de datos Pfam (http://pfam.sanger.ac.uk) con clara similitud a GTFB, evidente de los alineamientos y árboles filogenéticos. A resaltar que el nº. 9 es GTFB y que los números siguen el orden observado en el árbol filogenético de la Figura 2.

	Entrada UniProt	**Microrganismo**
1	B1YMN6[1]	Exiguobacterium sibiricum 255-15
2	C0X0D3	Lactobacillus fermentum ATCC 14931
3	C2F8B9	Lactobacillus reuteri MM4-1
4	C0YXW9	Lactobacillus reuteri MM2-3
5	A5VL73	Lactobacillus reuteri DSM 20016
6	B2G8K2	Lactobacillus reuteri JCM 1112
7	B7U9D3	Weissella confusa MBFB-1
8	A9Q0J0	Lactobacillus reuteri TMW1.106
9	**Q5SBM0**	**GTFB (Lactobacillus reuteri 121)**
10	Q5SBN1	Lactobacillus reuteri ML1
11	Q9R4L7[2]	Leuconostoc mesenteroides
12	B1YMN61	Exiguobacterium sibiricum 255-15

[1] Esta secuencia está listada dos veces en la tabla porque aparecen en el árbol dos fragmentos de la misma.
[2] La evidente similitud de secuencia del número 11 está basada solamente en 20 aminoácidos. Por tanto, esta secuencia se ha ignorado.

De las nueve secuencias análogas a GTFB, la posible dextransucrasa derivada de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 (nº 5 de la tabla) se clonó y se expresó en *Escherichia coli.* La proteína recombinante se purificó mediante una combinación de cromatografía por afinidad y de intercambio aniónico. La proteína purificada mostró una actividad análoga a GTFB cuando se incubó con malto oligosacáridos. La posible dextransucrasa derivada de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 no mostró actividad con la sacarosa, en su lugar, utiliza maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa como sustrato, produciendo una gama de productos más cortos y

más largos. El análisis mediante RMN de protón de los productos demostró que se habían introducido enlaces α-1,6-glucosídicos, como también se observó en incubaciones de GTFB. Adicionalmente, la posible dextransucrasa derivada de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 también aumentó el porcentaje de enlaces α-1,6-glycosidic en almidón de patata soluble de Sigma-Aldrich.

Clonación y expresión de GTFB

La versión de longitud completa, la truncada en el extremo N y el posible mutante nucleofílico de GTFB se construyeron y expresaron con éxito. Tanto la versión de longitud completa como la truncada en el extremo N mostraron una actividad clara sobre los malto-oligosacáridos tal como se determinó mediante TLC (no se muestran los datos). La construcción con la versión truncada de GTFB (GTFB-ΔN) no se expresó tan eficazmente como el GTFB de longitud completa y, por tanto, todos los experimentos se llevaron a cabo usando GTFB de longitud completa. Para descartar cualquier actividad de fondo procedente de la propia *E. coli*, se purificó un plásmido pET15b vacío, y después de purificar con la marca His no se detectó actividad de malto-oligosacáridos (G2-G7) (no se muestran los datos). Además, el (posible) mutante nucleofílico de longitud completa D1015N no mostró actividad sobre los malto-oligosacáridos (G2-G7; no se muestran los datos).

Características de la enzima

Se determinó la actividad óptima de GTFB con maltotetraosa como sustrato, tal como se determinó cualitativamente mediante TLC a una temperatura de 30-37 °C y un pH de 4-5 (no se muestran los datos). Las combinaciones de diferentes temperaturas y tampones de pH buffers indicaron actividad óptima a una temperatura de 37 °C y un pH de 4,7, que se utilizó en análisis posteriores.

Sustratos donantes

Puesto que ya se había demostrado que GTFB no podía utilizar la sacarosa como sustrato donante {Kralj, 2004}, se ensayaron varios análogos de la sacarosa (turanosa, palatinosa) y rafinosa para determinar su actividad. Los inventores no pudieron detectar actividad para ninguno de estos sustratos (no se muestran los datos). Tampoco se observó actividad sobre sustratos isomalto-oligosacáridos (IG5 y IG6) (no se muestran los datos). Tampoco se detectó actividad sobre oligosacáridos derivados de un hidrolizado de reuteran parcialmente purificado (GTFA) o panosa (no se muestran los datos). Sin embargo, se observó una actividad evidente sobre los malto-oligosacáridos lineales incluso con tiempos de incubación cortos. Especialmente para los malto-oligosacáridos con un grado de polimerización de 4 y mayor, se sintetizaron diferentes oligosacáridos (Fig. 3). A partir de un grado de polimerización de 6 y mayor comenzó a acumularse material polimérico junto con oligosacáridos. Para amilosa-V (Avehe, Foxhol, Países Bajos), también se observó baja actividad (principalmente la liberación de G1 y G2) (Fig. 5). Para la maltosa, no se observó prácticamente actividad. Sin embargo, cuando la amilosa- V se incubó simultáneamente con glucosa o maltosa, se sintetizó una gama de oligosacáridos (Fig. 5). Mediante el uso de amilosa-V como donante y glucosa como aceptor, se sintetizaron cantidades importantes de maltosa en comparación con la incubación solo con amilosa-V, indicando capacidad de síntesis (α1→4). Para amilosa-V prácticamente no se liberó G3. La incubación de amilosa-V con maltosa como aceptor proporcionó claramente panosa y G3 indicando capacidad GTFB, además de la panosa (que indica capacidad de síntesis (α1→6)) también se sintetizó maltotriosa demostrando la capacidad de la enzima de sintetizar enlaces (α1→4) glicosídicos.

Caracterización de producto en tiempo paraG6 y G7

Los primeros productos de reacción detectables para G6 fueron G1 (glucosa) y G5 (maltopentaosa) (Fig. 4). También para G7, los primeros productos liberados fueron G1 (glucosa) y G6 (maltohexaosa). Posteriormente para G6 también aparecieron otros malto-oligosacáridos tales como G2, G3 y G4. También se identificaron sacáridos desconocidos después de G7 y G8, que además de enlaces (α1→4) glucosídicos también contienen otros enlaces indicados por el desplazamiento en su tiempo de retención.

Tras la incubación de maltoheptaosa con GTFB durante 120 h, el espectro de RMN ^{1}H 1D de la mezcla total de productos (Fig. 7) indicó la presencia de enlaces (α1→6) recientemente formados mediante una señal amplia a δ_{H-1} ~ 4,96. La señal (α1→4) está presente a δ_{H-1} ~ 5,39. Después de 120 h de incubación, el cociente (α1→4):(α1→6) es 67:33, el cociente en la mezcla de productos. El análisis MALDI-TOF MS de la mezcla de productos reveló la presencia de compuestos comprendidos desde DP2 hasta DP35 (*m*/*z* 365 - *m*/*z* 5711, $[M+Na]^+$).

En la mezcla de reacción obtenida a partir de la incubación de MOS DP7 con GFTB recombinante, se pudieron elucidar mediante espectroscopía de RMN diecisiete estructuras diferentes (Figura 6), comprendidas desde DP2-DP10. Las estructuras elucidadas constituyen solamente una parte del número total de compuestos que se formaron. Estaban presentes productos de peso molecular más elevado, incluyendo polisacáridos. Es evidente que los oligosacáridos menores de DP7 deben proceder de la actividad hidrolítica de GTFB sobre el sustrato [productos que contienen solamente (α1→4)] así como de la actividad hidrolítica sobre los oligosacáridos formados [productos que contienen (α1→4) y (α1→6)]. También se resalta que no se han observado estructuras que tengan un resto de glucosa 6 sustituido con extremo reductor. Hasta el momento, solo se ha encontrado una estructura (DP8) que tenía

un resto glucosa con unión (α1→6) alargado mediante restos sucesivos de glucosa unidos mediante (α1→4). En el resto de los casos, solo se produjo (con éxito) alargamiento (α1→6). Todos los oligosacáridos tienen un resto glucosa 4 sustituido en el extremo reductor. Sin embargo, en el espectro RMN ^{1}H D1 (Fig. 7) de la mezcla total de productos se encontró una traza de una unidad -(1→)-D- Glc con extremo reductor (H-1α a δ 5,240 y H-1β a δ 4,669), pero esta unidad no se encontró en las estructuras elucidadas.

Por tanto, la GTFB recombinante cataliza solamente la escisión de los enlaces (α1→4) e inicia la formación de nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6). De esta manera se forman muchos productos, comprendidos de monosacáridos a polisacáridos (DP>30). Son posibles diferentes estructuras para un producto de una sola masa molecular, como se muestra claramente de los oligosacáridos(-alditoles) DP7 y DP8 formados. Además, se observó que la cantidad de enlaces (α1→6) comparado con los enlaces (α1→4) aumenta al aumentar la longitud de cadena, hasta un máximo de 50:50. No se introdujeron ramificaciones de tipo 4,6 ni otros tipos de puntos de ramificación. El hecho de que la enzima recombinante GTFB muestre actividades similares a los malto-oligosacáridos libres, así como en su forma reducida (malto-oligosacárido-alditoles), demuestra un mecanismo de alargamiento en el extremo no reductor.

Las conclusiones importantes que se pueden extraer de los resultados anteriores son los siguientes:

- no se han encontrado estructuras que tengan un resto glucosa 6 sustituido;
- GTFB cataliza solamente la escisión de los enlaces (α1→4) e inicia la formación de nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6);
- La cantidad de enlaces (α1→6) comparado con los enlaces (α1→4) aumenta al aumentar la longitud de la cadena hasta un máximo de 50:50;
- No se han introducido ramificaciones 4,6 ni otros tipos de puntos de ramificación;
- GTFB tiene un mecanismo de alargamiento en el extremo no reductor.

Introducción de actividad análoga a GTFB en GTFA mediante ingeniería de proteínas

Anteriores estudios de ingeniería de proteínas demostraron que los restos de aminoácidos situados en las regiones III y IV de la secuencia conservada (véase la figura 1 para el alineamiento de la secuencia) controlan la especificidad de producto de las enzimas de GTF en lo que respecta al tipo de enlace glucosídico formado. También, la región I y la región II contienen restos de aminoácidos que contribuyen a la actividad de la enzima y la especificidad de la reacción. Los restos de aminoácidos de las regiones de la secuencia conservada forman parte de la región de unión al sustrato aceptor de las enzimas de GTF. En la reacción de polimerización que utiliza sacarosa como sustrato, estos restos interactúan con los restos de glucosa (subsitios -) y fructosa (subsitio +1) de la sacarosa. Como GTFB utiliza maltoheptaosa (y otros malto-oligosacáridos) como sustrato, un resto glucosa interactuará en los subsitios del aceptor de la enzima GTFB. La especificidad de sustrato única de GTFB comparada con las GTF tradicionales resulta por tanto determinada con más probabilidad por diferencias en los subsitios aceptores. Así, para introducir actividad análoga a GTFB en una enzima GTFA tradicional se pretende sustituir restos en los subsitios aceptores situados en las regiones I, II, III y IV, para que se parezca a la secuencia de la enzima GTFB.

Además, la estructura 3D de GTF180 (Vujicic, memoria de tesis doctoral, Universidad de Groningen) muestra algunos restos adicionales que interactúan en los subsitios -1 y +1 que son igualmente importantes para la interconversión de la especificidad de reacción de las GTF. La mutación 981 L→V está basada en una interacción observada en la estructura 3D de GTF180, donde Leu981 tiene una interacción de Van Der Waals con el resto fructosilo de la sacarosa. En GTFB esta posición está ocupada por un resto valina como en las otras α-glucanotransferasas GTFDSM, GTF106B, GTFML4. Las mutaciones 1463 D→R, T o M están destinadas a sustituir el resto aspartato, que está fuertemente conservado en las glucansacarasas, pero no en GTFB y enzimas relacionadas, e interactúa con el resto de glucosa en el subsitio -1 de la estructura 3D de GTF180.

Adicionalmente, las mutaciones se pueden combinar de cualquier manera para obtener un efecto más fuerte en la alteración de la especificidad de reacción de las enzimas GTF. Las mutaciones propuestas son las siguientes:

Región I
posición W1510:W→I/L
posición P1512:P→
posición D1513:D→N

Región II
posición 1026: P→A

Región III
posición 1062: D→G
posición 1063: W→Y
posición 1064: N→H
posición 1062-1064 DWN→GYH

Región IV
posición 1134: N→Q
posición 1135: N→R
posición 1136: S→borrar este resto
posición 1134-1136: NNS→QR
posición 1137:Q→K

Estructura 3D
posición 981: L→V
posición 1414: N→L
posición 1463: D→R,T o M

REFERENCIAS

Arguello-Morales MA, Remaud-Simeon M, Pizzut S, Sarcabal P & Monsan P (2000) FEMS Microbiol. Lett. 182, 81-85.

Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, D.D., Moore, J.G., Seidman, J.G., Smith, J.A., & Struhl, K. (1987) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Barends TR, Bultema JB, Kaper T, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L & Dijkstra BW (2007) J. Biol. Chem. 282, 17242-17249.

Fabre E, Bozonnet S, Arcache A, Willemot RM, Vignon M, Monsan P & Remaud-Simeon M (2005) J. Bacteriol. 187, 296-303.

van Geel-Schutten GH, Faber EJ, Smit E, Bonting K, Smith MR, Ten Brink B, Kamerling JP, Vliegenthart JF & Dijkhuizen L (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65, 3008-3014.

Hard K, Van ZG, Moonen P, Kamerling JP & Vliegenthart FG (1992). Eur. J. Biochem. 209, 895-915.

Hondoh H, Kuriki T & Matsuura Y (2003) J. Mol. Biol. 326, 177-188.

van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L & van Geel-Schutten IG (2006). Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 157-176.

Kaditzky,S., Behr,J., Stocker,A., Kaden,P., & Vogel,R.F. Food Biotechnol. 22[4], 398-418. 2008.

Kamerling,J.P. & Vliegenthart,J.F. (1989) Mass Spectrometry. In Clinical Biochemistry - Principles, Methods, Applications. (Lawson, A.M., ed), pp. 176-263. Walter de Gruyter, Berlin.

Kelly RM, Dijkhuizen L & Leemhuis H (2009). J. Biotechnol. 140, 184-193

Kralj S, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, Leer RJ, Faber EJ, van der Maarel MJ & Dijkhuizen L (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68, 4283-4291.

Kralj S, van Geel-Schutten GH, van der Maarel MJ & Dijkhuizen L (2003). Biocatal. Biotransform. 21, 181-187.

Kralj S, van Geel-Schutten GH, Dondorff MM, Kirsanovs S, van der Maarel MJ & Dijkhuizen L (2004) Microbiology 150, 3681-3690.

Kralj S, van Geel-Schutten GH, van der Maarel MJ & Dijkhuizen L (2004) Microbiology 150, 2099-2112.

Kralj S, Stripling E, Sanders P, van Geel-Schutten GH & Dijkhuizen L (2005). Appl. Environ. Microbiol. 71, 3942-3950.

van Leeuwen SS, Kralj S, van Geel-Schutten IH, Gerwig GJ, Dijkhuizen L & Kamerling JP (2008) Carbohydr. Res. 343, 1237-1250.

van Leeuwen SS, Kralj S, van Geel-Schutten IH, Gerwig GJ, Dijkhuizen L & Kamerling JP (2008) Carbohydr. Res. 343, 1251-1265.

van Leeuwen SS, Leeflang BR, Gerwig GJ & Kamerling JP (2008) Carbohydr. Res. 343, 1114-1119.

Linden A, Mayans O, Meyer-Klaucke W, Antranikian G & Wilmanns M (2003). J. Biol. Chem. 278, 9875-9884. MacGregor EA, Jespersen HM & Svensson B (1996) FEBS Lett. 378, 263-266.

MacGregor EA, Janecek S & Svensson B (2001) Biochim. Biophys. Acta 1546, 1-20. Monchois V, Willemot RM & Monsan P (1999) FEMS Microbiol. Rev. 23, 131-151.

Moore AD, Bjorklund AK, Ekman D, Bornberg-Bauer E & Elofsson A (2008). Trends Biochem. Sci. 33, 444-451.

Peisajovich SG, Rockah L & Tawfik DS (2006) Nat. Genet. 38, 168-174.

Pijning T, Vuijicic Zagar A, Kralj S, Eeuwema W, Dijkstra BW & Dijkhuizen L (2008). *Biocatal. Biotransform.* **26,** 12-17.

Przylas I, Tomoo K, Terada Y, Takaha T, Fujii K, Saenger W & Strater N (2000) J. Mol. Biol. 296, 873-886. Rondeau-Mouro C, Veronese G & Buleon A (2006) Biomacromolecules. 7, 2455-2460.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., & Maniates,T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sarkar G & Sommer SS (1990). Biotechniques 8, 404-407.

Stam MR, Danchin EG, Rancurel C, Coutinho PM & Henrissat B (2006) Protein Eng Des Sel. 19, 555-562.

Tokuriki N & Tawfik DS (2009). Science. 324, 203-207.

Uitdehaag JC, Mosi R, Kalk KH, van der Veen BA, Dijkhuizen L, Withers SG & Dijkstra BW (1999) Nat. Struct. Biol. 6, 432-436.

Vuijicic Zagar, Universidad de Groningen. Memoria de tesis doctoral

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una mezcla de glucooligosacáridos que tiene dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos consecutivos y dos o más enlaces (α1→4) glucosídicos consecutivos, que comprende poner en contacto un sustrato de poli y/u oligosacáridos que comprende en su extremo no reductor al menos dos unidades de D-glucosa unidas en α-1→4 con una enzima α-glucanotransferasa capaz de escindir los enlaces (α1→4) glucosídicos y realizar nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos, y donde dicha α-glucanotransferasa es una enzima de tipo GTFB, o uno de sus homólogos funcionales que tiene la actividad enzimática especificada.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha α-glucanotransferasa se selecciona entre las enzimas que se muestran en la Tabla 2, o uno de sus homólogos que muestran al menos un 55% de identidad de la secuencia en los aminoácidos con una enzima que se muestra en la Tabla 2.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha α-glucanotransferasa se selecciona entre el grupo que consiste en GTFB procedente de *Lactobacillus reuteri* 121, GTF106B procedente de *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106, GTML4 procedente de *Lactobacillus reuteri* ML1, GTFDSM procedente de *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^{A} y GTF procedente de *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, o uno de sus homólogos que muestra al menos un 55% de identidad de la secuencia en los aminoácidos.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha α-glucanotransferasa muestra al menos un 60% de identidad de la secuencia en los aminoácidos con GTFB procedente de *Lactobacillus reuteri* 121.

5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha α-glucanotransferasa es una enzima genéticamente modificada que pertenece a tipo GTFA de las enzimas glucansacarasas que comprenden al menos una de las mutaciones de la Tabla 1, siendo capaz dicha enzima mutante de escindir enlaces (α1→4) glucosídicos y realizar nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos.

6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dicho sustrato tiene un grado de polimerización de al menos 4.

7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho sustrato se selecciona entre el grupo que consiste de almidón, almidón cerúleo, almidón con un elevado contenido de amilosa, derivados de almidón, maltooligosacáridos, amilosa, amilopectina, maltodextrinas, (α1→4) glucanos, reuteran, o sus combinaciones.

8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho almidón, almidón cerúleo, almidón con un elevado contenido de amilosa o derivado de almidón, se deriva de patata, maíz, tapioca, guisante, judía mungo, arroz o trigo.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde dicho derivado de almidón se produce tratando almidón, almidón cerúleo, o almidón con un elevado contenido de amilosa con una enzima amilomaltasa/4-alfa-glucanotransferasa o enzima ramificadora de glucógeno.

10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de aislar a partir de la mezcla al menos uno glucooligosacárido que tiene dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos consecutivos y dos o más enlaces (α1→4) glucosídicos consecutivos.

11. Un glucooligosacárido o resto de glucooligosacárido lineal de fórmula general A-B, o una mezcla que comprende glucooligosacáridos o restos de glucooligosacáridos lineales diferentes de fórmula general A-B, donde A comprende dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos consecutivos, donde el enlace entre A y B es un enlace (α1→6) glucosídico, y donde B comprende al menos dos restos de glucosa (α1→4) unidos consecutivos.

12. Glucooligosacárido o mezcla de glucooligosacáridos de acuerdo con la reivindicación 11, donde la relación entre los enlaces (α1→6) y (α1→4) glucosídicos varía entre 20:80 y 90:10.

13. Glucooligosacárido o mezcla de glucooligosacáridos de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, donde A comprende un isomaltooligosacárido con un grado de polimerización de al menos 4 restos de glucosa.

14. Glucooligosacárido o mezcla de glucooligosacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el grado de polimerización promedio es al menos de 7.

15. Composición nutritiva o cosmética que comprende un glucooligosacárido o una mezcla de glucooligosacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-14.

16. Composición nutritiva de acuerdo con la reivindicación 15, seleccionada entre el grupo que consiste en un producto lácteo, fórmula de bebé o infantil, producto de pastelería, barrita de cereales, barrita dulce, producto de pasta, producto de fideos, bebida líquida, bebida deportiva, bebida y helado.

17. Uso de un glucooligosacárido o mezcla de glucooligosacáridos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 como un aditivo nutritivo o cosmético.

18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, como fibra prebiótica.

19. Una enzima modificada genéticamente que pertenece al tipo GTFA de las enzimas glucansacarasas que comprende al menos dos de las mutaciones de la Tabla 1, siendo capaz dicha enzima mutante de escindir enlaces (α1→4) glucosídicos y realizar nuevos enlaces (α1→4) y (α1→6) glucosídicos y tener una preferencia por el sustrato por sustratos de poli y/u oligosacáridos que comprenden unidades de D-glucosa unidas (α1→4).

20. Uso de una enzima capaz de escindir enlaces (α1→4) glucosídicos y realizar nuevos enlaces α1→4) y (α1→6) glucosídicos, y/o transferir una unidad de maltosa, maltotriosa o maltotetraosilo realizando un nuevo enlace (α1→6) glucosídico, donde dicha enzima es una α-glucanotransferasa del tipo GTFB, o uno de sus homólogos funcionales que tiene la actividad enzimática especificada, en un método para producir derivados de almidón de fórmula general A-B, donde A comprende dos o más enlaces (α1→6) glucosídicos consecutivos, donde el enlace entre A y B es un enlace (α1→-6) glucosídico, y donde B comprende al menos dos restos de glucosa (α1→-4) unidos consecutivos.

Figura 1

Cepa bacteriana	Enzima	II	III	IV	I
A		1 2 *1019*	3 *1055*	45 *1128*	6 7
Lb. reuteri 121	GTFB	FDGFRVDAADNIDADVLDQ	HLSYNEGYHSGAA	WSFVTNHDQR-KNLI	GLKVQEDIVMNQ
Lb. reuteri TMW 1.106	GTF106B	FDGFRVDAADNIDADVLDQ	HLSYNEGYHSGAA	WSFVTNHDQR-KNLI	GLKVQEDIVMNQ
Lb. reuteri ML1	GTFML4	FDGFRVDAADNIDADVLDQ	HLSYNEGYHSGAA	WSFVTNHDQR-KNLI	GLKVQEDIVMNQ
Lb. reuteri DSM 20016[A]	GTFDSM	FDGFRVDAADNIDADVLDQ	HLVYNEGYHSGAA	WSFVTNHDQR-KNVI	GLKVQEDLVMNQ
		1015	***1053***	***1125***	*1484*
B					
Ln. mesenteroides NRRL B-1299	DSRE CD2	FDSIRIDAVDFIHNDTIQR	HISLVEAGLDAGT	YSIIHAHDKGVQEKV	NMQVMADVVDNQ
Ln. mesenteroides ATCC 8293	DSRF CD2	FDSIRIDAVDFIDNDAIQR	HISLVEAGLDAGT	YSIIHAHDKGIQEKV	NMQVMADVVDNQ
C					
Lb. reuteri 121	GTFA	FDSVRVDAPDNIDADLMNI	HINILEDWNHADP	YSFVRAHDNNSSDQI	GLQVMADWVPDQ
Lb. reuteri TMW 1.106	GTFA106	FDSIRVDAVDNVDADLLNI	HLNILEDWSHADP	YTFIRAHDSNASDQI	GLQVMADWVPDQ
Lb. reuteri ATCC 55370	GTFO	FDSVRVDAPDNIDADLMNI	HINILEDWNSSDP	YSFIRAHDNNSSDQI	GLQVMADWVPDQ
Lb. reuteri 180	GTF180	FDGIRVDAVDNVDVDLLSI	HINILEDWGWDDP	YNFVRAHDSNASDQI	GLQAIADWVPDQ
Lb. reuteri ML1	GTFML1	FDSIRVDAVDNVDADLLDI	HINILEDWGGQDP	YSFIRAHDNGSSDDI	GIQAMADWVPDQ
Lb. parabuchneri 33	GTF33	FDGYRVDAVDNVDADLLNI	HLSILEDWDNNDP	YTFIRAHDSEVSTII	GIQAIDDWVPDQ
Lb. sakei Kg15	GTFKg15	FDSVRVDAVDNVDADLLNI	HLSILEDWGHNDP	YSFVRAHDSEVSTVI	GIQVMADFVPDQ
Lb. fermentum Kg3	GTFKg3	FDAIRIDAVDNVDADLLQL	HLSILEDWSHNDP	YSFVRAHDSEVSTVI	GMQVMADFVPDQ
Ln. mesenteroides NRRL B-1299	DSRE CD1	FDGYRVDAVDNVDADLLQI	HISILEDWDNNDS	YAFIRAHDSEVSTVI	GIQAINDWVPDQ
Ln. mesenteroides ATCC 8293	DSRF CD1	FDGYRVDAVDNVNADLLQI	HISILEDWDNNDP	YSFIRAHDSEVSTVI	GIQAINDWVPDQ

Figura 2

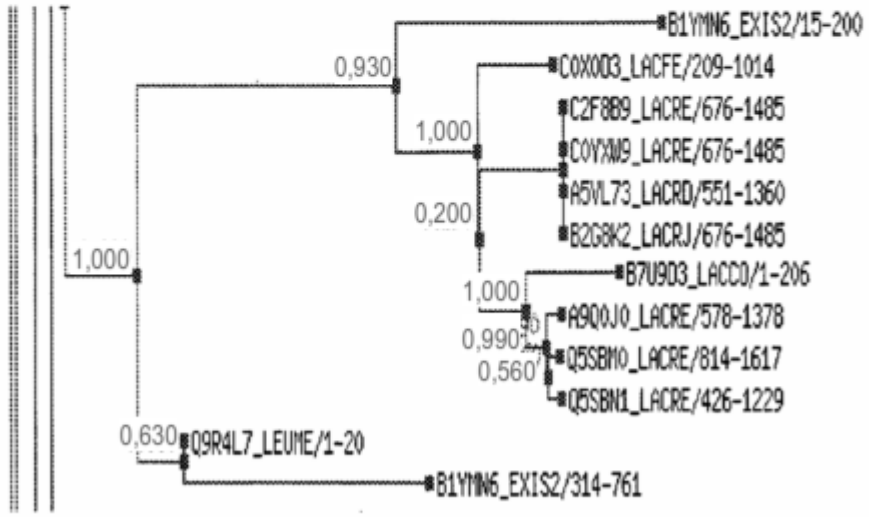

B1YMN6_EXIS2/15-200
0,930
C0X0D3_LACFE/209-1014
C2F8B9_LACRE/676-1485
1,000
C0YXW9_LACRE/676-1485
A5VL73_LACRD/551-1360
0,200
B2G8K2_LACRJ/676-1485
1,000
B7U9D3_LACCO/1-206
1,000
A9Q0J0_LACRE/578-1378
0,990
Q5SBM0_LACRE/814-1617
0,560
Q5SBN1_LACRE/426-1229
0,630
Q9R4L7_LEUME/1-20
B1YMN6_EXIS2/314-761

Figura 3

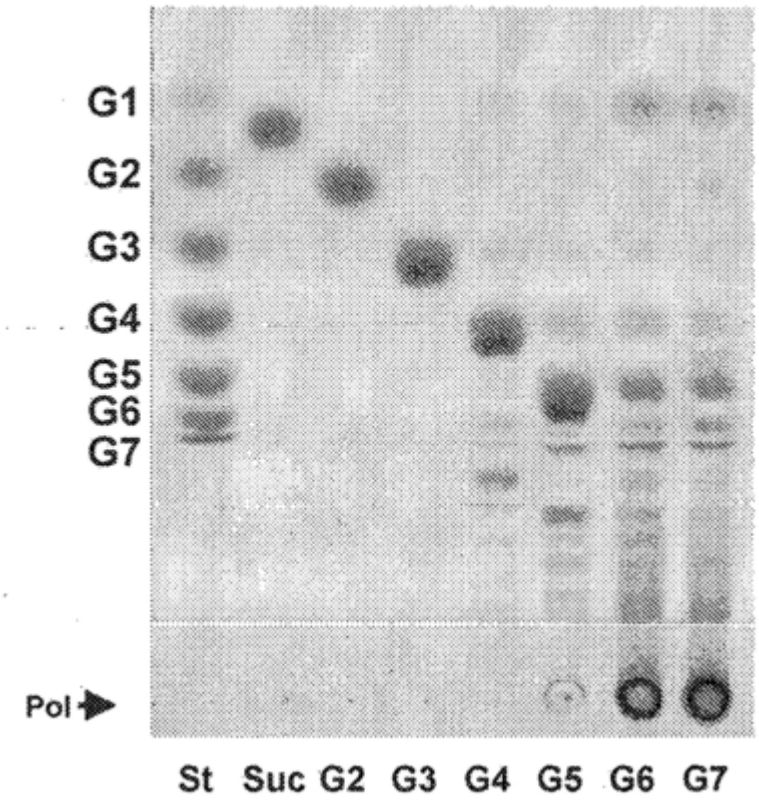


Figura 4

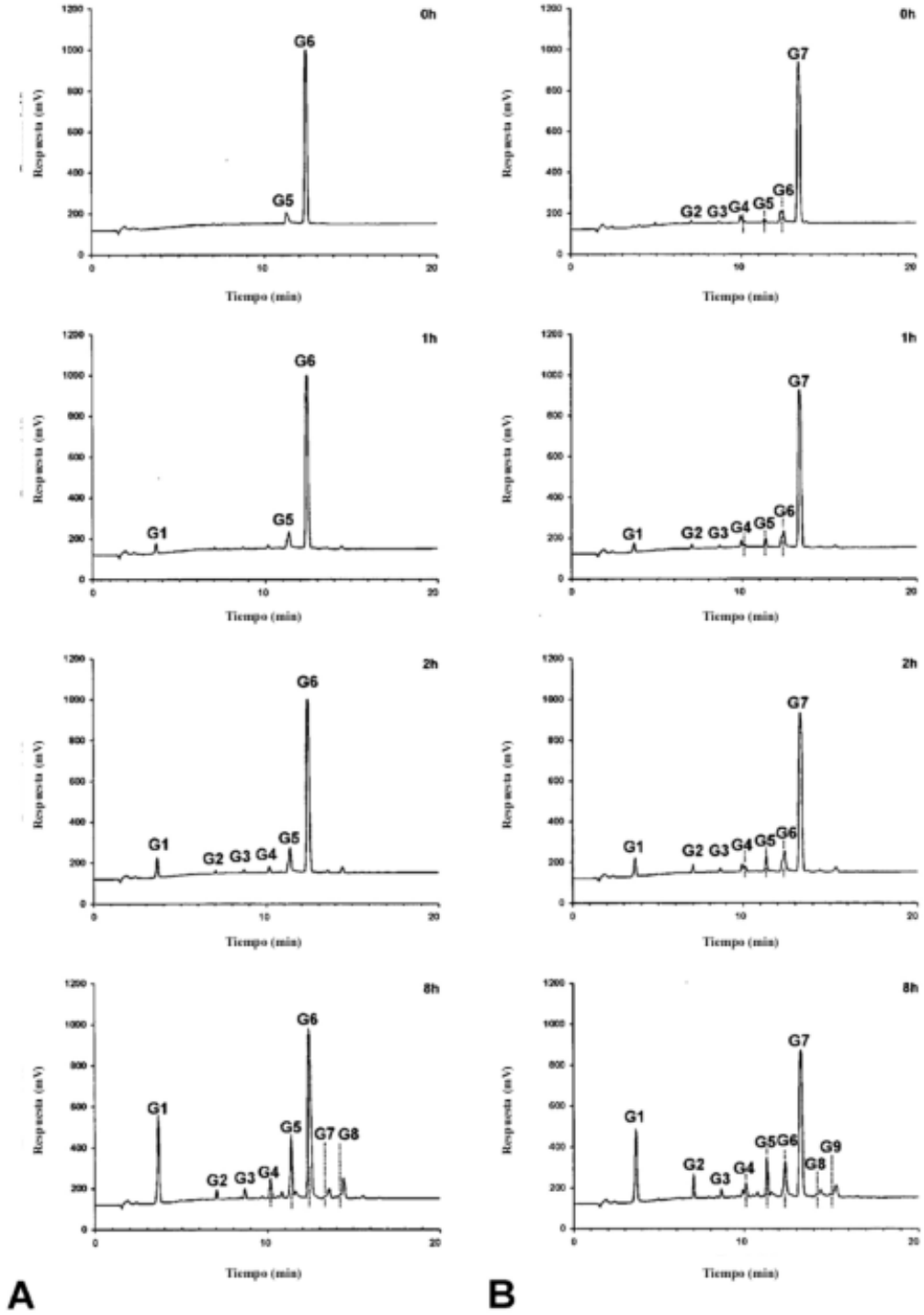


Figura 5

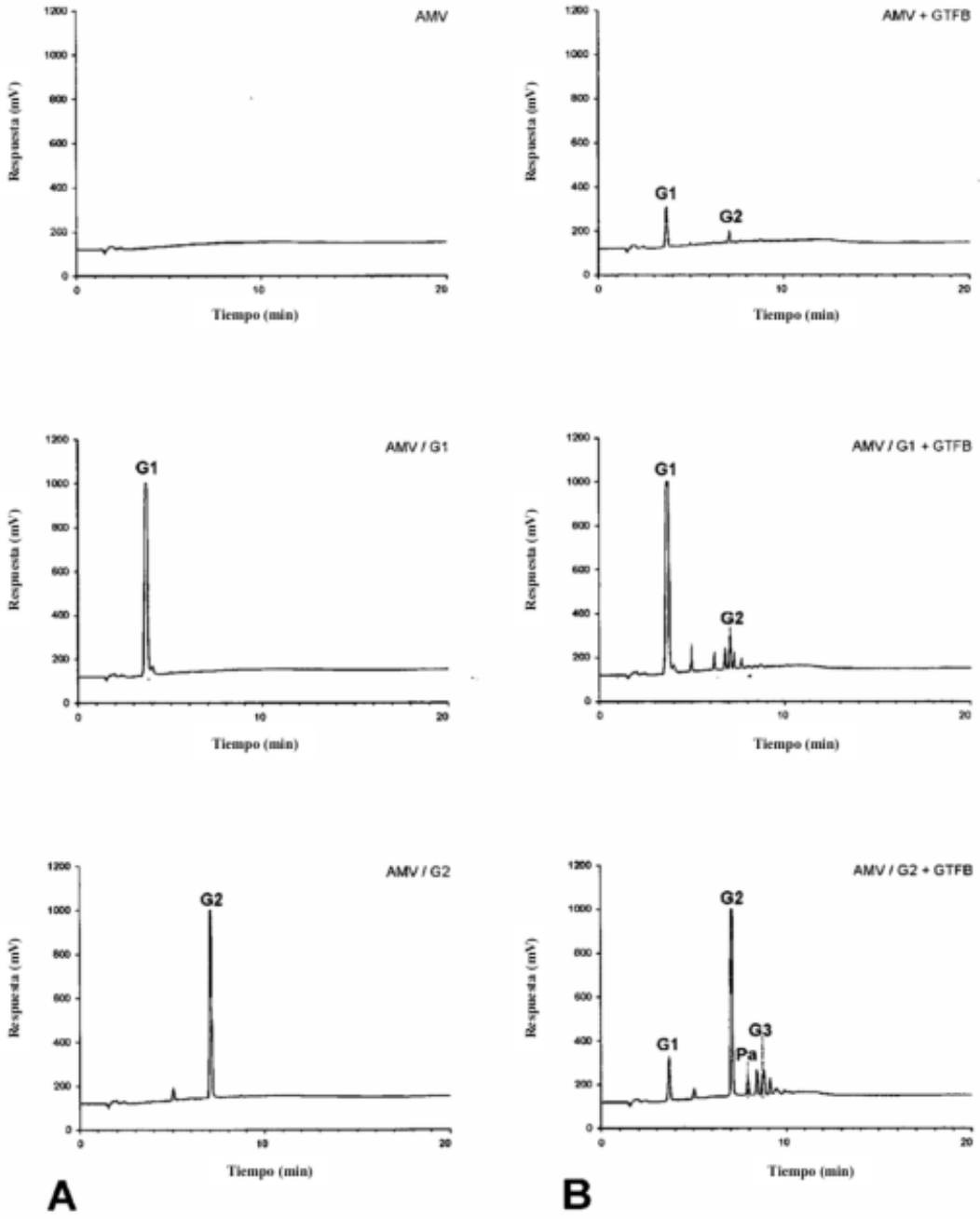
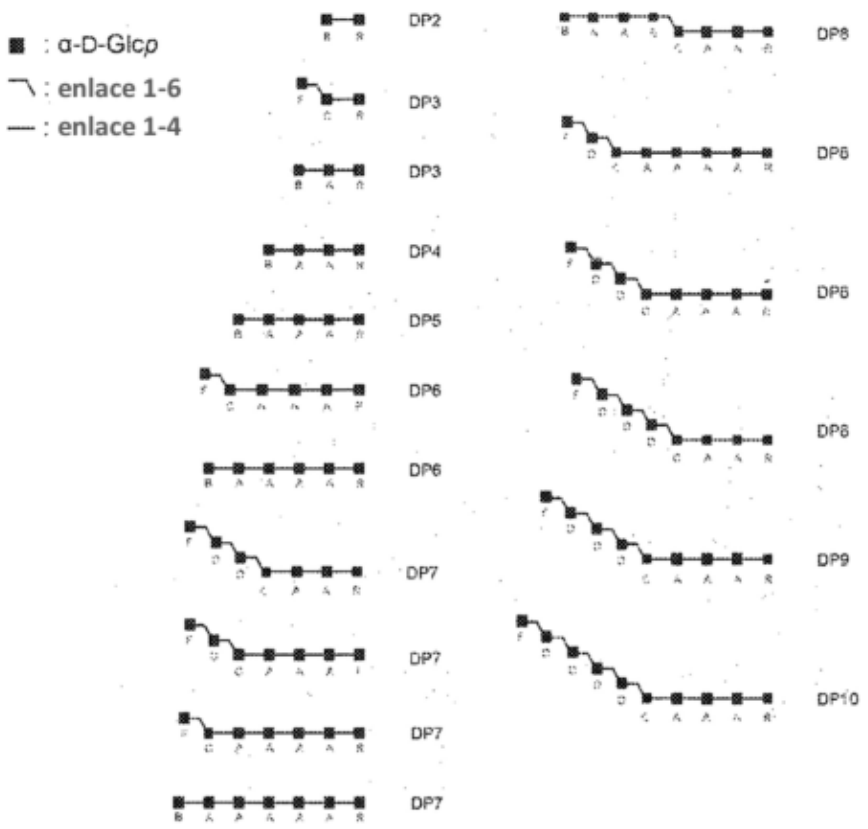

AMV
AMV + GTFB
AMV / G1
AMV / G1 + GTFB
AMV / G2
AMV / G2 + GTFB
Respuesta (mV)
Tiempo (min)
G1
G2
G3
Pa
A
B

Figura 6



A -{1→4}-α-D-Glcp-{1→4}-
B α-D-Glcp-(1→4)-
C -{1→6}-α-D-Glcp-{1→4}-
D -{1→6}-α-D-Glcp-{1→6}-
E -{1→4}-α-D-Glcp-{1→6}-
F α-D-Glcp-(1→6)-
Rα/β -{1→6}-D-Glcp
Rα/β -{1→4}-D-Glcp

Figura 7

A -(1→4)-α-D-Glcp-(1→4)-
B α-D-Glcp-(1→4)-
C -(1→6)-α-D-Glcp-(1→4)-
D -(1→6)-α-D-Glcp-(1→6)-
E -(1→4)-α-D-Glcp-(1→6)-
F α-D-Glcp-(1→6)-
Rα/β -(1→6)-D-Glcp
Rα/β -(1→4)-D-Glcp

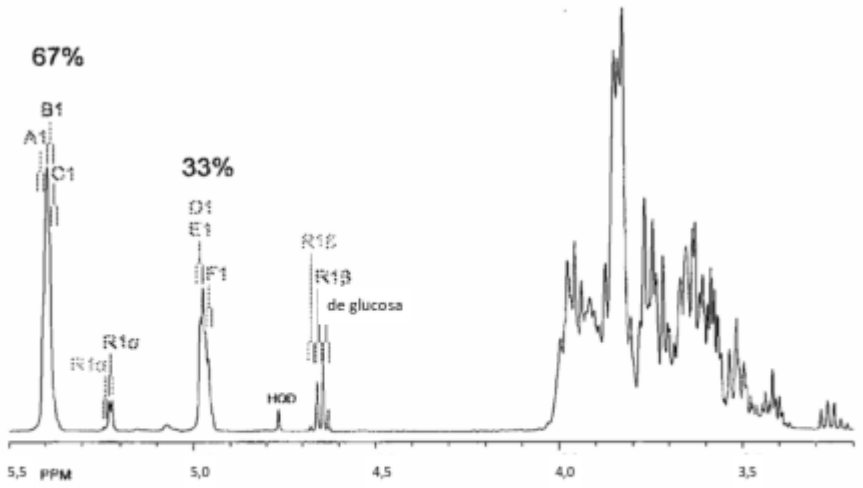
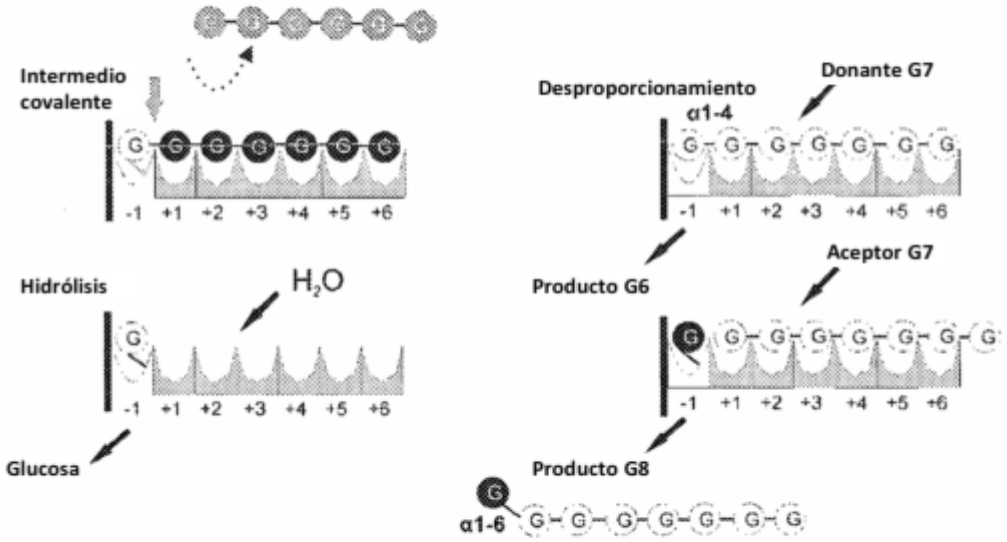


Figura 8


Intermedio covalente
Hidrólisis
H_2O
Glucosa
Desproporcionamiento α1-4
Donante G7
Producto G6
Aceptor G7
Producto G8
α1-6
-1 +1 +2 +3 +4 +5 +6