

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 167**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12 (2006.01)

C12N 9/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2006 E 06819802 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1954808**

54 Título: **Preparación de enzima que produce un sabor puro**

30 Prioridad:

28.11.2005 EP 05111392

25.04.2006 EP 06113062

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2014

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

HET OVERLOON 1

6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:

DE SWAAF, MAXIMILIAAN PETER MARIE;

VAN DIJK, ALBERTUS ALARD;

EDENS, LUPPO y

DEKKER, PETRUS JACOBUS THEODORUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 454 167 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

Preparación de enzima que produce un sabor puro

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para producir un producto lácteo.

5 Antecedentes de la invención

El uso de enzimas para mejorar la naturaleza química, fisico-química u organoléptica de productos de grado alimentario está ampliamente extendido. También en el procesamiento de leche de vaca y otros sustratos derivados de animales, el uso de enzimas añade un valor significativo al producto final. Los ejemplos son incubaciones con lactasa para hacer a la leche aceptable a individuos intolerantes con la lactosa, la hidrólisis proteolítica de caseína y proteínas del suero de la leche para aliviar alergenicidades y mejorar las características de espuma, la modificación de fosfolípidos del huevo usando fosfolipasa A2 para mejorar el comportamiento de cocción y estabilizar las mayonesas, el uso de transglutaminasa en productos de carne y de pescado para mejorar la dureza y elasticidad, así como la eliminación de oxígeno de los productos de huevo o queso rayado añadiendo glucosa oxidasa. Adicionalmente, los tratamientos enzimáticos se están usando para potenciar el sabor de diversos productos alimentarios derivados de animales. Por ejemplo, las proteasas están siendo usadas para acelerar el desarrollo de sabor en extractos de pescado y de carne. Además, la aceleración del desarrollo del sabor en queso es una diana bien conocida. Mientras que el EMC (queso modificado con enzimas) es un producto consolidado en el que se usan principalmente diversas lipasas, la aceleración de los cambios de sabor sutiles implicados en el envejecimiento de los quesos al añadir pequeñas cantidades de exoproteasas, lipasas o esterases es un desarrollo más reciente.

20 La invención se refiere a lactasa. La lactasa o β -galactosidasa (E.C: 3.2.1.23) es una enzima que cataliza la hidrólisis de lactosa (un disacárido) en sus componentes monosacáridos glucosa y galactosa. La lactosa está presente en productos lácteos, y más específicamente la leche, leche desnatada, nata y otros productos lácteos. La ruptura de la lactosa se produce en la pared intestinal del cuerpo humano (y de otros mamíferos) por la presencia natural de lactasa.

25 Los problemas nutricionales y funcionales provocados por la lactosa en la mayoría de poblaciones que carecen de lactasa son bien conocidos y están descritos. Los miembros de tales poblaciones no pueden hidrolizar la lactosa, que en tales casos pasa al intestino grueso, donde produce deshidratación, pobre absorción de calcio, diarrea, flatulencia, erupción y calambres, y, en casos graves, incluso diarrea acuosa explosiva.

30 Una aplicación industrial importante de la lactasa es en la producción de productos lácteos con lactosa hidrolizada para individuos intolerantes a la lactosa. Tales productos lácteos hidrolizados incluyen leche pasteurizada, leche UHT y leche reconstituida de todos o de parte de sus constituyentes originales con o sin etapas de procesamiento intermedias tales como hidrólisis proteica. El tratamiento con lactasa se puede realizar antes o después del tratamiento térmico de la leche. El tratamiento con lactasa se puede realizar añadiendo la enzima a la leche. Las propiedades de solubilidad de la lactosa son tales que pueden conducir a su cristalización, conduciendo a una textura arenosa o grumosa. Tal textura indeseada se puede encontrar en algunos productos lácteos tales como leche condensada, leche evaporada, leche seca, leche congelada, helado, y en productos de pastelería con un contenido elevado de leche. La hidrólisis completa o parcial de la lactosa por lactasa elimina este problema, proporcionando productos con una textura homogénea y, como resultado, una mayor aceptación por el consumidor.

40 Otra aplicación industrial de la lactasa es para incrementar el sabor dulce en productos que contienen lactosa, como la leche o el yogur. La hidrólisis de la lactosa en tales productos da como resultado un mayor sabor dulce como resultado de la producción de glucosa. Otra aplicación industrial de lactasa es la hidrólisis de productos de lactosa que contienen componentes lácteos, tales como el pan. La lactosa se añade en tales productos para potenciar el sabor, retener la humedad, proporcionar un color pardo y mejorar las propiedades de tostado. Los jarabes de lactosa hidrolizada son prometedores en términos de, por ejemplo, potenciar el desarrollo del color de la corteza, mejorar el sabor y el aroma, modificar la textura, prolongar el período de caducidad, y robustecer la estructura de la hogaza.

45 La hidrólisis de la lactosa por lactasa en productos lácteos fermentados, tales como yogur, aumentará el sabor dulce. Sin embargo, cuando se añade la lactasa antes del comienzo del proceso fermentativo, puede incrementar la velocidad de desarrollo de ácido, y reducir de este modo los tiempos de procesamiento. El tratamiento con lactasa de leche o productos derivados de la leche tales como el suero hace a tales productos adecuados para la aplicación en piensos para animales y alimentos para mascotas para aquellos animales intolerantes a la lactosa, tales como gatos. La hidrólisis de la lactosa permite la fabricación de suero lácteo más concentrado y, al mismo tiempo, evita problemas del intestino, similares a los descritos previamente para pacientes con deficiencia de lactosa. El suero lácteo con lactosa hidrolizada se concentra para producir un jarabe que contiene 70-75% de sólidos, y se usa como ingrediente alimentario en helado, productos de panadería y de pastelería.

55 Las lactasas se han descrito para y aislado de una gran variedad de organismos, incluyendo microorganismos. La lactasa es a menudo un componente intracelular de microorganismos como *Kluyveromyces* y *Bacillus*. *Kluyveromyces* y especialmente *K. fragilis* y *K. lactis*, y otras levaduras tales como aquellas de los géneros *Candida*,

Torula y *Torulopsis*, son una fuente habitual de lactasas enzimáticas de levaduras, mientras que *B. coagulans* o *B. circulans* son fuentes bien conocidas para lactasas bacterianas. Existen varias preparaciones de lactasa comerciales, derivadas de estos organismos, tales como Maxilact® (de *K. lactis*, producida por DSM, Delft, Países Bajos). Todas estas lactasas son denominadas lactasas neutras, puesto que tienen un óptimo de pH entre pH = 6 y pH = 8. Varios organismos tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* pueden producir lactasa extracelular, y la patente US 5.736.374 describe un ejemplo de tal lactasa, producida por *Aspergillus oryzae*. Las propiedades enzimáticas de lactasas como óptimo de pH y de temperaturas varían entre especies. En general, sin embargo, las lactasas que son excretadas muestran un menor óptimo de pH de pH = 3,5 a pH = 5,0; las lactasas intracelulares muestran habitualmente un mayor óptimo de pH en la región de pH = 6,0 a pH = 7,5, pero se producen excepciones a estas reglas generales. La elección de una lactasa neutra o ácida depende del perfil de pH en la aplicación. En aplicaciones con pH neutro, habitualmente se prefieren lactasas neutras; tales aplicaciones incluyen leche, helado, suero lácteo, queso, yogur, leche en polvo, etc. Las lactasas ácidas son más adecuadas para aplicaciones en el intervalo ácido. La concentración apropiada de lactasa depende de la concentración inicial de lactosa, del grado requerido de hidrólisis, del pH, la temperatura y del tiempo de hidrólisis.

Aunque dirigido a mejorar la funcionalidad y/o perfiles de sabor del producto alimentario, ocasionalmente un tratamiento enzimático puede tener efectos secundarios inesperados e indeseables. Un ejemplo de un efecto secundario indeseable es el desarrollo de un sabor rancio como resultado del tratamiento enzimático.

Mettall et. al, The Australian Journal of Dairy Technology, (1991), 46-48, describen el problema del desarrollo de un sabor rancio cuando la leche es tratada con lactasa. Según esta publicación, niveles elevados de proteasa darán como resultado el desarrollo rápido de sabores rancios. Por lo tanto, los procedimientos de producción se optimizan para minimizar actividades secundarias proteolíticas, a fin de reducir el riesgo de la formación de sabor rancio. En el documento WO 02/081673 se describe un ejemplo de un procedimiento de purificación para lactasa derivada de *K. lactis*.

Se encuentra que incluso las preparaciones de lactasa con baja actividad de proteasa pueden todavía dar lugar a la formación de un sabor rancio. Este es especialmente el caso para las lactasas neutras, derivadas del citoplasma de levadura. La formación del sabor rancio que está asociada con el uso de preparaciones de lactasa es especialmente crítica para leche UHT con lactosa hidrolizada. Las lactasas que se usan en este caso son lactasas neutras debido a su óptimo de pH favorable para la leche. La leche UHT ha recibido un tratamiento con mucho calor para obtener un período de caducidad de varios meses a temperatura ambiente. Los tiempos de almacenamiento prolongados fuera del frigorífico hacen a estos productos especialmente tendentes a formar un sabor rancio: incluso una velocidad de formación de sabor rancio muy baja puede dar lugar a una formación importante de sabor rancio después de varios meses de almacenamiento, haciendo al producto poco atractivo para el consumo.

Kim Chang Sup et al (Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase in *Escherichia coli*, Biotechnology letters, volumen 25, n° 20, octubre de 2003, páginas 1769-1774) describen la expresión y caracterización de beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en *Escherichia coli*.

M. Becerra et al (Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase purification, Biological procedures online, volumen 1, n° 1, 14 de mayo de 1998, páginas 48-58) describen la necesidad de beta-galactosidasa de *K. lactis* purificada para usarla como un antígeno para inducir anticuerpos específicos. Describen métodos para purificar beta-galactosidasa para obtener suficiente enzima purificada en una única etapa y minimizar tanto como sea posible la cantidad de extracto bruto necesaria.

M. Becerra et al (Micro-scale purification of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active, Biotechnology techniques, volumen 12, n° 3, marzo de 1998, páginas 253-256) describen la purificación a escala reducida y la estimación de la masa molecular en condiciones naturales y desnaturizantes de beta-galactosidasa de *K. lactis* procedente tanto de un extracto bruto como de una preparación comercial.

El documento WO 02/081673 describe una disolución de lactasa que comprende menos de 10 g/kg de poli- y oligosacáridos.

Lactase: an optimum enzyme for low lactose dairy products (Asia pacific food industry (suplemento), junio de 2001, páginas 24-27) describe el uso de la enzima lactasa para preparar productos con contenido reducido en lactosa.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, ahora se encuentra que la presencia de arilsulfatasa como actividad secundaria contaminante en preparaciones enzimáticas, incluso a niveles muy bajos, puede conducir a un fuerte desarrollo de sabor rancio en un producto cuando un sustrato se trata con la preparación, y que el uso de una preparación enzimática que no tiene actividad de arilsulfatasa, o tiene actividad reducida de arilsulfatasa, da como resultado una fuerte reducción del desarrollo del sabor rancio.

En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento, para producir un producto lácteo, que comprende usar una preparación de una lactasa neutra que comprende menos de 30 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa.

5 La preparación de lactasa puede usarse ventajosamente en productos alimentarios y de piensos para hidrolizar lactosa sin la formación de compuestos de sabor rancio.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la aril-sulfatasa es una actividad enzimática crucial, responsable de la formación del sabor rancio. Se han encontrado pruebas confirmatorias añadiendo aril-sulfatasa a leche UHT, y que dio como resultado que esta enzima individual es capaz de imitar el sabor rancio observado a menudo en leche UHT tratada con lactasa.

10 Sin desear estar atados por ninguna teoría científica, se cree que la hidrólisis de conjugados metabólicos, en particular alquilfenoles sustituidos con un grupo sulfato, mediante las arilsulfatasas es un mecanismo que da como resultado el desarrollo de sabor rancio. En consecuencia, las preparaciones enzimáticas son particularmente ventajosas para el tratamiento de sustratos que contienen un alquilfenol sustituido con un grupo sulfato.

Descripción detallada de la invención

15 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir un producto lácteo, que comprende usar una preparación de una lactasa neutra procedente de *Kluyveromyces* que comprende menos de 30 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa. Preferiblemente, la lactasa comprende menos de 20 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa, más preferiblemente menos de 10 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa. Las unidades de aril-sulfatasa se definen en el ejemplo 2, y están normalizadas para la actividad de lactasa expresada en NLU, y también se define en el ejemplo 2.

20 La lactasa puede ser una lactasa producida intracelularmente o extracelularmente. En una realización preferida, la lactasa es lactasa producida intracelularmente.

En una realización preferida, la lactasa es una lactasa neutra. La lactasa neutra puede tener un óptimo de pH entre pH = 6 y pH = 8.

25 Las preparaciones de lactasas neutras derivan habitualmente del citoplasma de microorganismos. Su producción incluye la fermentación (a gran escala) del microorganismo, seguido del aislamiento de la lactasa. Esto último requiere la destrucción de la pared celular a fin de liberar la enzima del citoplasma. Se pueden usar varias técnicas para obtener la lisis celular, incluyendo la permeabilización de la pared celular por disolventes orgánicos tales como octanol, tratamiento con ultrasonidos o prensa francesa. Otras enzimas, además de la lactasa, son liberadas al mismo tiempo del citoplasma, incluyendo proteasas.

30 En una realización preferida, la lactasa tiene menos de 0,5 RFU/min. de actividad de proteasa por NLU de actividad de lactasa.

35 Las lactasas intracelulares que se pueden purificar como se describe aquí se han descrito y aislado de una gran variedad de organismos, incluyendo microorganismos. La lactasa es a menudo un componente intracelular de microorganismos como *Kluyveromyces* y *Bacillus*. *Kluyveromyces* y especialmente *K. lactis*, *K. marxinus* y *K. fragilis*, y otras levaduras tales como aquellas del género *Candida*, *Torula* y *Torulopsis*, son una fuente habitual de lactasas enzimáticas de levadura, mientras que *B. coagulans* o *B. circulans* son fuentes bien conocidas para lactasas bacterianas. Existen varias preparaciones de lactasa comerciales, derivadas de estos organismos, tales como Maxilact® (procedente de *K. lactis*, producida por DSM). Todas estas lactasas son lactasas denominadas neutras, puesto que tienen un óptimo de pH entre pH = 6 y pH = 8.

40 Las lactasas intracelulares se han descrito para diversas especies, y para varias de ellas se conocen sus secuencias de aminoácidos y/o sus secuencias de ADN. La información de secuencia está disponible públicamente en bases de datos de secuencias, por ejemplo en GenBank (Bethesda, Maryland USA), European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL-Bank en Hinxton, UK), el DNA Data Bank of Japan (Mishima, Japón) y el Swissprot (Suiza). Las lactasas se pueden identificar en genomas basándose en homología en las secuencias génicas y/o proteicas. Las preparaciones brutas de enzimas intracelulares se caracterizan por la presencia de varias enzimas que sólo aparecen en el citoplasma de la célula, tal como las enzimas implicadas en el metabolismo central de la célula, incluyendo aquellas implicadas en la glucólisis.

45 También se han descrito lactasas extracelulares. Generalmente se reconocen como enzimas extracelulares debido a que contienen una secuencia peptídica denominada secuencia líder. Esta secuencia líder es reconocida en cierta manera por la célula que produce las enzimas como una señal de que la enzima debería ser exportada fuera de la célula. Durante la secreción, habitualmente se elimina la secuencia líder. Las lactasas extracelulares se han descrito para diversas especies, por ejemplo *Aspergillus oryzae*. Las preparaciones brutas de lactasas extracelulares se caracterizan por la presencia de enzimas extracelulares y la presencia de enzimas extracelulares típicas como proteasas. El tipo de enzimas extracelulares encontrado varía con el organismo, y son típicos para ese organismo.

55

Debido a la lisis celular durante la fermentación o el procesamiento, se pueden encontrar niveles bajos de enzimas intracelulares en tales preparaciones de enzimas extracelulares.

Las enzimas lactasa se pueden clasificar así como extracelulares o intracelulares basándose en la comparación de su secuencia de aminoácidos con aquellas de otras lactasas conocidas. En principio, una lactasa intracelular puede estar provista de una secuencia líder. Esto podría dar como resultado la excreción de la lactasa desde la célula al medio. Las preparaciones brutas de tales enzimas se caracterizarían por una lactasa, clasificada como intracelular en base a su secuencia de aminoácidos, en presencia de enzimas extracelulares típicas y ausencia de niveles, o niveles bajos, de enzimas intracelulares típicas.

Las lactasas intracelulares preferidas usadas en la presente invención son: lactasa de *K. lactis* que tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en http://www.ebi.uniprot.org/entry/BGAL_KLULA, o una lactasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, preferiblemente al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de *K. lactis*. La lactasa de *K. marxianus* que tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en http://www.ebi.uniprot.org/entry/Q6QTF4_KLUMA, o una lactasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, preferiblemente al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de *K. lactis*. La lactasa de *B. circulans* que tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en <http://www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/uniProtView.do?proteinId=O31341> BACCI&pager.offset=0 <http://www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/uniProtView.do?proteinId=Q45092> BACCI&pager.offset=0 <http://www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/uniProtView.do?proteinId=Q45093> BACCI&pager.offset=0, o una lactasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, preferiblemente al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de *B. circulans*.

Las expresiones "homología" o "porcentaje de identidad" se usan aquí de forma intercambiable. Se define aquí que, a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir saltos en la secuencia de la primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Entonces se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones nucleotídicas correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones que solapan) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud. La persona experta estará al tanto del hecho de que existen varios programas de ordenador diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y el peso de salto de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. La persona experta apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se ve alterado significativamente cuando se usan algoritmos diferentes.

La preparación de lactasas intracelulares requiere la destrucción de las células para liberar la enzima lactasa. Al mismo tiempo, se liberan otras enzimas citoplásmicas. La calidad de una preparación industrial de la lactasa se determina mediante la relación de actividades secundarias a actividad de lactasa. Especialmente las proteasas son enzimas secundarias críticas, puesto que se sabe que conducen a efectos secundarios indeseados en la aplicación, tal como la coagulación de la leche o la formación de un sabor rancio en la leche. La formación de un sabor rancio es especialmente crítica en productos con un período de caducidad prolongado y que se almacenan a temperaturas ambiente. Uno de tales productos es la leche UHT, y la formación del sabor rancio es un problema conocido para la leche UHT con lactasa hidrolizada. La leche UHT es muy sensible a la formación de sabor rancio; cuando una preparación de lactasa no genera un sabor rancio en la leche UHT, tampoco generará habitualmente un sabor rancio en otras aplicaciones. Los compuestos asociados con la formación del sabor rancio en la leche, y especialmente leche UHT, están relacionados tanto con la reacción de proteólisis como la reacción de Maillard (Valero et al (2001) Food Chem. 72, 51-58). Cualesquiera proteasas presentes como actividades secundarias en preparaciones de lactasa realzan potencialmente la formación del sabor rancio; no está claro qué niveles de proteasas son necesarios, pero podrían ser importantes con tiempos de almacenamiento de varios meses incluso actividad proteolítica muy baja. La leche UHT es muy sensible a la formación de sabor rancio; cuando una preparación de lactasa no genera sabor rancio en leche UHT, distinto de los sabores rancios descritos (por ejemplo, como se describe en Valero et al (2001) Food Chem. 72, 51-58), habitualmente tampoco generará un sabor rancio en otras aplicaciones. La aplicación de UHT es por lo tanto un buen método para evaluar la calidad de las preparaciones de lactasa con respecto a su potencial para la formación de un sabor rancio. Puesto que las proteasas se consideraron al menos parcialmente responsables de la formación del sabor rancio, los esfuerzos se han enfocado en reducir los niveles de proteasa de los productos de lactasa. Sin embargo, se ha encontrado que una reducción de los niveles de proteasa no conduce a la eliminación total de la formación del sabor rancio en leche UHT. Sorprendentemente, se ha encontrado que la aril-sulfatasa es una actividad enzimática crucial, responsable de la formación del sabor rancio.

Hemos encontrado pruebas confirmatorias añadiendo aril-sulfatasa a leche UHT, lo cual dio como resultado que esta enzima individual fuese capaz de imitar el sabor rancio observado a menudo en leche UHT tratada con lactasa.

Se describe un procedimiento cromatográfico para eliminar la aril-sulfatasa de la enzima lactasa, que deriva preferiblemente de *K. lactis*.

5 Se realizó un análisis sensorial detallado de diversas muestras de leche UHT que o bien no contenían un sabor rancio o bien que contenían niveles significativos de sabor rancio (ejemplo 1). Estos análisis sensoriales se combinaron con análisis detallado de la composición química de las muestras. Se identificaron diversos compuestos como compuestos de aroma claves, y la mayoría de ellos se habían descrito previamente como asociados con leche UHT. Sorprendentemente, también se identificó a *p*-cresol como un compuesto clave de sabor rancio. Este compuesto no había sido descrito previamente entre los compuestos de sabor rancio en leche UHT (Valero et al (2001) Food Chem. 72, 51-58). Se puede generar mediante aril-sulfatasa a partir de su conjugado de sulfato que está presente en cantidades muy pequeñas (niveles de ppb) en la leche (V. Lopez, R.C. Lindsay J Agric. Food Chem. (1993), 41, 446-454; M. Kilic y R.C. Lindsay, J Dairy Sci (2005) 88, 7-12; M Kilic y R.C. Lindsay J Agric Food Chem (2005) 53, 1707-1712). Sorprendentemente se ha encontrado que aril-sulfatasa es una actividad enzimática en preparaciones de lactasa y responsable de la formación del sabor rancio. Se confirmó esto añadiendo aril-sulfatasa a leche UHT, y se encontró que esta única enzima es de hecho capaz de evitar el sabor rancio observado a menudo en leche UHT tratada con lactasa. Subsecuentemente se desarrolló un procedimiento cromatográfico para eliminar la aril-sulfatasa de la enzima lactasa, que deriva de *K. lactis*. Se encontró que la eliminación de aril-sulfatasa también da como resultado la eliminación de la formación del sabor rancio en leche UHT, como se concluye de los ensayos con paneles de gusto. Los niveles de aril-sulfatasa en el producto de lactasa final son <20 unidades de aril-sulfatasa, preferiblemente <10 unidades de aril-sulfatasa, incluso más preferiblemente <8 unidades de aril-sulfatasa, y lo más preferible 0 unidades de aril-sulfatasa. Las unidades de aril-sulfatasa se definen en el ejemplo 2 y se normalizan para la actividad de lactasa expresada en NLU y también se define en el ejemplo 2). Se han descrito varias rutas de purificaciones para lactasas (por ejemplo en el documento WO 02/081673), pero estos procedimientos de purificación no estaban dirigidos a eliminar la aril-sulfatasa. Los presentes resultados muestran que aril-sulfatasa y lactasa, ambas derivadas de *K. lactis*, tienen un comportamiento de elución muy similar en cromatografía de intercambio iónico (Q-sefarosa) y de interacción hidrófoba (butil-sefarosa). Por lo tanto, se espera que las rutas de la técnica anterior descritas no darán como resultado preparaciones de lactasa libres de actividad de aril-sulfatasa.

30 Además de la reducción de los niveles de aril-sulfatasa en preparaciones de lactasa mediante cromatografía, hay otras maneras para reducir o eliminar la actividad de aril-sulfatasa de la preparación de lactasa. Estas son 1) la adición de sulfato al medio de crecimiento. Se sabe que el sulfato reprime la expresión de aril-sulfatasa (Beil et al. (1995) Eur. J. Biochem. 229, 385-394), y por lo tanto se espera que la adición de sulfato al medio reduzca los niveles de aril-sulfatasa; 2) la eliminación o destrucción del gen para aril-sulfatasa a partir del genoma del organismo mediante técnicas de mutagénesis al azar o mediante un enfoque dirigido usando, *por ejemplo*, tecnologías de biología molecular conocidas por la persona experta en la técnica, 3) el cribado y selección de una cepa que es una productora baja natural o no productora de actividad de aril-sulfatasa; 4) la adición de un inhibidor de la enzima. Se sabe, *por ejemplo*, que ciertas clases de aril-sulfatasas son inhibidas por iones fosfato.

40 Los conjugados metabólicos, tales como sulfatos, glucurónidos y fosfatos, están presentes en la leche procedente de diversas especies, incluyendo leche de vaca (Lopez et al (1993) J Agric Food Chem. 41, 446-454; Kilic et al (2005) J Dairy Sci 88, 7-12). La conjugación metabólica es un medio universalmente aceptado de detoxificación y potenciación de la solubilidad acuosa de sustancias extrañas en mamíferos. Los conjugados se forman muy eficazmente por el hígado y el riñón, y circulan en el torrente sanguíneo antes de la eliminación principalmente en la orina y bilis. Se han encontrado conjugados de alquilfenoles y una variedad de otros compuestos en la leche procedente de, por ejemplo, vaca, cabra y oveja (Lopez et al (1993) J Agric Food Chem. 41, 446-454). La naturaleza y diversidad de los conjugados metabólicos es muy amplia, e incluyen conjugados de tiofenoles, fenoles, *o*-cresol y *p*-cresol. La conjugación puede dar como resultado la unión de grupos sulfato, fosfato o glucurónido. Estos grupos pueden ser liberados del conjugado mediante enzimas como aril-sulfatasas, fosfatasas y glucuronidasas, dando como resultado la liberación del compuesto tóxico. Se ha demostrado la presencia de varios tipos de conjugados en la leche de vaca, oveja y cabra; la abundancia relativa de los conjugados varía entre las preparaciones, y está relacionada al menos parcialmente con la especie (Lopez et al (1993) J Agric Food Chem. 41, 446-454). En leche de vaca, se demostró que los conjugados de sulfato son los conjugados más abundantes, pero en leche de oveja los conjugados de fosfato son más abundantes que los sulfatos (Lopez et al (1993) J Agric Food Chem. 41, 446-454).

55 En la presente solicitud se demuestra que los conjugados que están presentes en la leche son el sustrato para actividades secundarias en preparaciones de lactasa neutra. Se sabe que los niveles de concentración de estos conjugados pueden variar para una especie con el tiempo (Kilic et al, (2005) J dairy Sci 88, 7-12) y entre especies (Lopez et al (1993) J Agric Food Chem. 41, 446-454). Se anticipa que esto puede afectar a los requisitos para la preparación de lactasa. Por ejemplo, se anticipa que, para leche de oveja, en la que los conjugados de fosfato son muy abundantes, la tolerancia para los niveles de fosfatasa en preparaciones de lactasa es mucho menor en comparación con la situación en la que la misma preparación de lactasa se usa en leche de vaca, que tiene niveles muy bajos de conjugados de fosfato. A este respecto, no hay diferencia entre preparación de lactasa intracelular o preparaciones de lactasa extracelular.

Se describe aquí un procedimiento para tratar un sustrato con una preparación enzimática. La preparación enzimática está preferiblemente libre de forma sustancial de aril-sulfatasa.

Como se usa aquí, una preparación enzimática sustancialmente libre de arilsulfatasa puede englobar cualquier preparación enzimática en la que la actividad de arilsulfatasa no está presente o está presente en un nivel suficientemente bajo que, con la dosificación eficaz de la actividad enzimática pretendida en el procedimiento de producción relevante, no se produce en dicho procedimiento de producción ninguna descomposición observable de alquilfenoles sulfatados con efectos organolépticos negativos asociados como se describe anteriormente.

Como se usa aquí, una preparación enzimática sustancialmente libre de arilsulfatasa puede englobar una preparación enzimática en la que la relación de la actividad de arilsulfatasa dividida entre la actividad de la enzima de interés está por debajo de un valor específico. Las relaciones preferidas pueden variar dependiendo de la enzima y de la aplicación usada.

Por actividad de arilsulfatasa se quiere decir la actividad de éster sulfúrico hidrolasa para escindir un sulfato de fenol en el resto de fenol y de sulfato como se describe para EC 3.1.6.1. La definición para la unidad de arilsulfatasa se proporciona en la sección de Materiales y Métodos (y en el ejemplo 2) de la presente solicitud. Las definiciones para las actividades de las otras enzimas también se pueden encontrar en la sección de Materiales y Métodos de la presente solicitud.

Se describe aquí una preparación enzimática que comprende una lactasa (neutra), preparación enzimática la cual comprende menos de 30 unidades (ASU) de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa. Preferiblemente, la preparación enzimática comprende menos de 20 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa, más preferiblemente menos de 10 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa.

El tratamiento de un sustrato con una preparación enzimática sustancialmente libre de arilsulfatasa también puede englobar el tratamiento de un sustrato en el que el nivel de arilsulfatasa en el sustrato durante dicho tratamiento está por debajo de un valor específico.

En la invención, el nivel de arilsulfatasa en el sustrato durante dicho tratamiento puede ser como máximo $500 \cdot 10^3$ unidades de arilsulfatasa por litro de sustrato, preferiblemente como máximo $250 \cdot 10^3$, preferiblemente como máximo $100 \cdot 10^3$, preferiblemente como máximo $50 \cdot 10^3$, preferiblemente como máximo $25 \cdot 10^3$ unidades de arilsulfatasa por litro de sustrato. Se encontró que el mantenimiento del nivel de arilsulfatasa por debajo de los valores mencionados anteriormente es particularmente ventajoso cuando el sustrato es leche, preferiblemente leche de vaca.

Una preparación enzimática sustancialmente libre de arilsulfatasa también puede englobar una preparación enzimática obtenida purificando una preparación de enzima bruta que contiene una enzima de interés y arilsulfatasa, en la que la arilsulfatasa se separa de la enzima de interés.

También se describe un procedimiento para preparar una preparación enzimática, procedimiento el cual comprende purificar una preparación de enzima bruta que contiene una enzima de interés y arilsulfatasa, en la que la arilsulfatasa se separa de la enzima de interés. El procedimiento puede comprender ventajosamente tratar un sustrato con la preparación enzimática purificada.

La etapa de purificación tiene el efecto de que se reduce la actividad de arilsulfatasa con respecto a la actividad de la enzima de interés. Preferiblemente, la purificación da como resultado una reducción de la actividad de arilsulfatasa de al menos 50%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99%. La persona experta apreciará que se entiende que esto significa que preferiblemente $(a_{AS,pur}/a_{enz,pur})/(a_{AS,bruta}/a_{enz,bruta}) \leq 0,5$, preferiblemente $\leq 0,2$, preferiblemente $\leq 0,1$, preferiblemente $\leq 0,05$, preferiblemente $\leq 0,01$, en el que

$a_{AS,pur}$ = actividad de arilsulfatasa en la preparación enzimática purificada (unidad/ml)

$a_{enz,pur}$ = actividad de la enzima de interés en la preparación enzimática purificada (unidad/ml)

$a_{AS,bruta}$ = actividad de arilsulfatasa en la preparación de enzima bruta (unidad/ml)

$a_{enz,bruta}$ = actividad de la enzima de interés en la preparación de enzima bruta (unidad/ml)

La purificación se puede efectuar de cualquier manera adecuada. En una realización preferida, la purificación es mediante cromatografía. Los procedimientos para purificar preparaciones enzimáticas usando cromatografía son conocidos per se. La selección de los métodos de separación cromatográfica más apropiados depende de las características moleculares tanto de la enzima relevante como de la actividad de arilsulfatasa relevante presente. Las características moleculares relevantes son el punto isoelectrónico, la hidrofobia, la distribución de cargas de superficie molecular, el peso molecular de la enzima relevante, y la actividad secundaria, así como otras varias propiedades químicas de la proteína. Se puede encontrar un antecedente práctico sobre el uso de estas

características a la hora de seleccionar el procedimiento de separación cromatográfica apropiado en el Protein Purification Handbook (publicado por Amersham Pharmacia Biotech, actualmente GE Healthcare Bio-Sciences, Diegem, Bélgica). Los métodos de separación cromatográfica adecuados comprenden cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión de tamaños, cromatografía de interacción hidrófoba, y otros. Para la presente invención, se prefiere la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de interacción hidrófoba.

La purificación se puede realizar en una única etapa de separación cromatográfica. El hecho de que la actividad enzimática se puede separar eficazmente de la actividad de arilsulfatasa contaminante en una única etapa cromatográfica es particularmente ventajoso para la aplicabilidad industrial del procedimiento según la invención.

La enzima usada es una lactasa. En lo sucesivo se describen enzimas que se pueden usar según la invención.

Los esquemas internacionalmente reconocidos para la clasificación y nomenclatura de todas las enzimas se proporcionan mediante IUMB. Un texto de IUMB actualizado para los números EC se puede encontrar en el sitio de internet: <http://www.chem.gmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/11/>. En este sistema, las enzimas se definen por el hecho de que catalizan una única reacción. Esto implica que varias proteínas diferentes se describen todas ellas como la misma enzima, y una proteína que cataliza más de una reacción es tratada como más de una enzima.

La lactasa (EC 3.2.1.23), una beta-galactosidasa microbiana capaz de descomponer la lactosa, es de particular relevancia dentro del alcance de la presente solicitud.

Las preparaciones enzimáticas de grado alimentario, industrialmente disponibles, se obtienen típicamente de tejido de mamífero, por ejemplo tripsina del páncreas, o de material vegetal, por ejemplo papaína de frutas de papaya. En una realización preferida, la enzima se obtiene de una cepa microbiana, por ejemplo bacterias, por ejemplo especie *Bacillus*, o levaduras, por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* o *Pichia*, u hongos filamentosos. Los hongos filamentosos que se sabe que producen preparaciones enzimáticas de grado alimentario son, por ejemplo, *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* y *Talaromyces*. La preparación enzimática se puede producir mediante o puede derivar de un hongo filamentoso, por ejemplo *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. Como se usa aquí, tales preparaciones enzimáticas también engloban preparaciones enzimáticas autoclonadas producidas por *A. niger* o por *A. oryzae*.

La enzima de interés se puede producir mediante procedimientos de fermentación microbiana usando hongos que producen y segregan preferiblemente la proteasa de interés en el caldo de fermentación. En la técnica, tales procedimientos de fermentación son conocidos; véase, por ejemplo, el documento WO 02/45524. En los procedimientos de la técnica anterior, la enzima se puede recuperar del caldo de fermentación mediante técnicas también conocidas en la técnica. Como una primera etapa, las células del organismo de producción se pueden separar del caldo mediante centrifugación o filtración. El caldo libre de células se puede concentrar, mediante ultrafiltración, y subsiguientemente se puede purificar cromatográficamente. Las cepas fúngicas producen típicamente más de una actividad de arilsulfatasa, de manera que la separación cromatográfica de la enzima relevante a partir de estas actividades de arilsulfatasa en una única etapa no es trivial. Una complicación adicional es que las diferentes actividades enzimáticas segregadas por un microorganismo específico, es decir, la actividad enzimática buscada, así como las diversas actividades de arilsulfatasa, tienen puntos isoeléctricos muy próximos entre sí. Con la separación cromatográfica de la actividad enzimática deseada y las actividades de arilsulfatasa contaminantes, se puede estabilizar la preparación enzimática purificada así obtenida.

En el caso en el que la enzima no se segregue por el microorganismo sino que siga siendo intracelular, el organismo de producción se puede recuperar mediante filtración o centrifugación, después de lo cual las células retenidas se pueden lisar para liberar la actividad enzimática relevante. Después de otra etapa de filtración o centrifugación para eliminar el desecho celular, la fracción líquida se puede concentrar y estabilizar como se describe anteriormente para la enzima segregada.

Las preparaciones enzimáticas purificadas y líquidas se pueden concentrar y mezclar con estabilizantes conocidos, tales como glicerol u otros polioles. Como alternativa, se pueden obtener preparaciones sólidas a partir de disoluciones enzimáticas concentradas mediante etapas conocidas de precipitación y/o evaporación, seguido de técnicas de secado (por pulverización) bien conocidas.

Se puede tratar un sustrato con la preparación enzimática. El sustrato puede ser cualquier sustrato adecuado. Preferiblemente, el sustrato es un sustrato proteínico. El sustrato proteínico puede ser cualquier sustrato que comprenda proteína. En una realización preferida, el sustrato contiene proteína de la leche, por ejemplo caseína y/o proteína del suero de la leche. Los ejemplos de sustratos preferidos son leche, productos derivados de la leche, productos de leche fermentada (por ejemplo yogur), suero lácteo y/o hidrolizados. El sustrato también puede comprender carne.

Como hidrolizado, se puede usar cualquier producto que se forme mediante hidrólisis enzimática de una proteína de sustrato proteínico, preferiblemente una proteína de sustrato derivada de animal. Se prefieren hidrolizados de proteína del suero lácteo, hidrolizados de caseína e hidrolizados de leche desnatada.

El sustrato puede contener un alquilfenol sustituido con un grupo sulfato. Por alquilfenol se quiere decir un grupo fenol del cual se ha sustituido al menos un protón aromático por un grupo alquilo. La longitud del grupo alquilo puede variar, y puede estar ramificado o sustituido. Los alquilfenoles preferidos son metil- y etilfenoles.

5 Por alquilfenol sulfatado se quiere decir un alquilfenol que está conjugado con el grupo hidroxilo mediante sulfatación.

Arilsulfatasa (EC 3.1.6.1) es una éster sulfúrico hidrolasa capaz de escindir un sulfato de alquilfenol en el resto alquilfenol y en el resto sulfato.

10 El tratamiento del sustrato puede implicar cualquier procedimiento en el que un sustrato se pone en contacto con la preparación enzimática. El tratamiento puede implicar cualquier procedimiento en el que el sustrato se incubaba en presencia de la preparación enzimática. La preparación enzimática se puede añadir al sustrato de cualquier manera adecuada.

15 El procedimiento puede ser cualquier procedimiento en el que se produzca un producto, por ejemplo un producto nutritivo, preferiblemente un producto lácteo. Como se usa aquí, un producto lácteo engloba cualquier composición que contenga proteína de la leche, por ejemplo caseína y/o proteína de suero lácteo. Los ejemplos son leche, productos derivados de la leche, productos de leche fermentada (por ejemplo yogur), leche condensada, leche evaporada, leche seca, leche congelada, helado, suero lácteo; y/o queso. El producto también puede ser un hidrolizado.

La preparación enzimática se puede usar para preparar cualquier producto adecuado, por ejemplo un producto nutritivo, preferiblemente un producto lácteo.

20 La invención también se refiere al uso de la preparación enzimática según la invención para evitar o reducir el desarrollo de un sabor rancio.

Se describe un procedimiento para producir una célula hospedante que es una cepa deficiente en arilsulfatasa, que comprende someter un cultivo que produce arilsulfatasa a condiciones tales que parte del cultivo se modifica para formar la célula hospedante que es deficiente en arilsulfatasa, y aislar la célula hospedante.

25 En una realización preferida, se usan condiciones de mutagénesis, preferiblemente condiciones de mutagénesis al azar, tales como mutagénesis física o química.

30 En una realización preferida, se usan técnicas de manipulación genética recombinante, preferiblemente destrucción génica de una etapa, inserción de marcador, mutagénesis dirigida al sitio, supresión, interferencia de ARN, ARN antisentido. También se describe un procedimiento para producir un polipéptido mediante un método que comprende:

(a) cultivar una célula hospedante deficiente en arilsulfatasa en un medio nutriente, en condiciones que conduzcan a la expresión del polipéptido

(b) expresar el polipéptido en dicha célula hospedante, y

(c) recuperar opcionalmente el polipéptido del medio nutriente o de la célula hospedante.

35 También se describe un procedimiento para producir un polipéptido mediante un método que comprende:

(a) transformar una célula hospedante deficiente en arilsulfatasa con un vector de expresión, en el que el vector expresa el polipéptido,

(b) cultivar la célula hospedante en un medio nutriente, en condiciones que conduzcan a la expresión del polipéptido

40 (c) expresar el polipéptido en la célula hospedante, y

(d) recuperar opcionalmente el polipéptido del medio nutriente o de la célula hospedante.

También se describe un procedimiento para producir un polipéptido mediante un método que comprende:

(a) cultivar una célula hospedante en un medio nutriente que prohíbe la producción de arilsulfatasa y en condiciones que conduzcan a la expresión del polipéptido

45 (b) expresar el polipéptido en dicha célula hospedante, y

(c) recuperar opcionalmente el polipéptido del medio nutriente o de la célula hospedante.

También se describe un procedimiento para producir un polipéptido mediante un método que comprende:

- (a) transformar una célula hospedante con un vector de expresión, en el que el vector expresa el polipéptido,
- (b) cultivar la célula hospedante en un medio nutricional que prohíbe la producción de arilsulfatasa y en condiciones que conduzcan a la expresión del polipéptido
- (c) expresar el polipéptido en la célula hospedante, y
- 5 (d) recuperar opcionalmente el polipéptido del medio nutricional o de la célula hospedante.

El polipéptido puede ser una enzima. Se describe un procedimiento para preparar una preparación enzimática, comprendiendo dicho procedimiento preparar una enzima mediante un procedimiento como se describe aquí, y recuperar una preparación enzimática a partir del medio nutricional o de la célula hospedante.

Más abajo se da una descripción adicional.

10 Represión fermentativa

La preparación enzimática se puede producir usando una cepa hospedante industrial que se cultiva en un medio de crecimiento que limita o prohíbe la producción de arilsulfatasas. Para *Pseudomonas aeruginosa*, se ha descrito que tras el cultivo en un medio que contiene un exceso de sulfato como única fuente de azufre, no se pudo detectar un nivel significativo de arilsulfatasa, mientras que el uso de etanosulfonato como la única fuente de azufre conduce a la producción de cantidades significativas de actividad de arilsulfatasa (Beil et al. (1995) Eur. J. Biochem. 229, 385-394). Por lo tanto, es concebible que el uso de un exceso de sulfato en el medio de fermentación también tiene un efecto represor sobre la producción de actividad de arilsulfatasa en microorganismos industrialmente más importantes. El crecimiento del organismo de producción enzimática en un medio que contiene un exceso de sulfato como fuente de azufre puede conducir por lo tanto a la producción de productos enzimáticos preferibles con una cantidad reducida de actividad de arilsulfatasa. Por exceso de sulfato en el medio se quiere decir aquí que todavía queda en el caldo una cantidad significativa de sulfato libre después de que se ha terminado el crecimiento del microorganismo. No se requiere para esta invención que el sulfato sea la única fuente de azufre en el medio de crecimiento, en tanto que la cantidad molar de sulfato en el medio de crecimiento sea mayor que la cantidad molar de cualquier otra sustancia que contenga azufre, durante el período de crecimiento completo. Adicionalmente, también se puede usar cisteína o tiocianato en lugar de sulfato como fuente de azufre preferida en la represión de la actividad de arilsulfatasa. Adicionalmente, también es importante tener una cantidad significativa de sulfato, u otra fuente de azufre represora, en todas las disoluciones durante las etapas de lavado, almacenamiento y otras etapas de procesamiento aguas abajo, para evitar la desrepresión de la actividad de arilsulfatasa en el caldo, incluso tras el final de la fermentación.

30 Mejora de cepa clásica

Una cepa deficiente en arilsulfatasa se puede obtener mediante ingeniería genética usando técnicas de manipulación genética recombinante, sometiendo al hospedante a mutagénesis, o ambas. La modificación o inactivación de los genes que codifican arilsulfatasa de la presente invención puede resultar de someter a la célula progenitora a mutagénesis y seleccionar células mutantes en las que se ha reducido la capacidad de expresar arilsulfatasas en comparación con la célula progenitora. La mutagénesis, que puede ser específica o al azar, se puede realizar, por ejemplo, mediante el uso de un agente mutagenizador físico o químico adecuado, mediante el uso de un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis se puede realizar mediante el uso de cualquier combinación de estos agentes mutagenizadores.

Los ejemplos de agentes mutagenizadores físicos o químicos adecuados para el presente fin incluyen radiación gamma o ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etilmetanosulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos nucleotídicos. Cuando se usan tales agentes, la mutagénesis se realiza típicamente incubando la célula progenitora a mutagenizar en presencia del agente mutagenizador de elección en condiciones adecuadas, y seleccionando células mutantes que muestren expresión reducida del gen. Como alternativa, tales cepas se pueden aislar usando técnicas genéticas, tales como hibridación o emparejamiento, y fusión de protoplastos o cualquier otra técnica genética clásica para inducir diversidad genética. La cepa deficiente en arilsulfatasa obtenida se puede seleccionar subsiguientemente monitorizando el nivel de expresión de la arilsulfatasa. Opcionalmente, la cepa deficiente en arilsulfatasa se selecciona subsiguientemente midiendo el nivel de expresión de un gen de interés dado a expresar en la célula hospedante. La selección de cepas que tienen actividad de arilsulfatasa reducida se puede realizar midiendo directamente la actividad de arilsulfatasa en el caldo de cultivo, en el sobrenadante del cultivo, en células permeabilizadas, o en el lisado celular. Para medir la actividad de arilsulfatasa, es posible permeabilizar opcionalmente células de la cepa de producción industrial, incubar con un sustrato fluorescente (tal como sulfato de 4-metilumbeliferona (MUS)), hasta que el sustrato ha sido captado por las células, y cribar células con menor actividad de arilsulfatasa midiendo la disminución de la fluorescencia. Tal medición se puede realizar directamente usando un fluorímetro convencional en cultivos individuales, o se puede realizar preferiblemente mediante citometría de flujo de tal manera que las células con baja fluorescencia se pueden retirar mediante clasificación y se pueden

usar para el cultivo adicional. Las células usadas en tal procedimiento se pueden mutagenizar o no antes de la incubación con el sustrato fluorescente.

Como alternativa, las cepas que tienen actividad de arilsulfatasa reducida se pueden aislar mediante selección de cepas que no son capaces de crecer en ésteres de sulfato de ésteres alquílicos (tales como sulfato o etanosulfonato de cresilo) como única fuente de azufre en el medio de crecimiento.

El aislamiento de las cepas adecuadas puede requerir que se apliquen varias rondas de técnicas genéticas clásicas, especialmente en cepas de producción industrial que no son haploides, sino diploides, aneuploides, o tienen una ploidía diferente, tal como es el caso de muchas cepas de levadura industriales, o en el caso de que la cepa de producción industrial contenga múltiples genes que codifiquen arilsulfatasa, tal como es el caso en hongos.

Técnicas de ADN recombinante

Como alternativa, se pueden construir cepas de producción industrial que tienen una cantidad reducida de actividad de arilsulfatasa usando tecnología de ADN recombinante. En la técnica se describen varias técnicas para la inactivación génica o destrucción génica, tal como la destrucción génica de una etapa, inserción de marcadores, mutagénesis dirigida al sitio, supresión, interferencia de ARN, ARN antisentido, y otras, y todas se pueden usar para reducir, inhibir o interrumpir la síntesis de la actividad de arilsulfatasa a fin de obtener una cepa de producción industrial con menor actividad de arilsulfatasa. También es parte de la presente invención la inactivación de arilsulfatasa alterando la secuencia o secuencias de control que dirigen la expresión del gen de arilsulfatasa. Un ejemplo de esto es la reducción de la actividad promotora por interrupción del gen.

Usando técnicas de modificación genética modernas, se puede obtener una cepa recombinante deficiente en arilsulfatasa, preferiblemente interrumpiendo un gen que codifica la actividad de arilsulfatasa, más preferiblemente insertando un gen marcador en un gen que codifica la actividad de arilsulfatasa, muy preferiblemente mediante eliminación del genoma de parte o de toda la región codificante de arilsulfatasa. Los métodos para llevar a cabo tales inactivaciones génicas se han descrito para muchos organismos diferentes, y se conocen por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP357127) y también se describen en el Ejemplo 8. De ese modo, se puede reducir o eliminar la expresión de arilsulfatasas en la célula mutante. Dependiendo de la cepa hospedante que se modifique usando estas técnicas, el procedimiento se debería repetir varias veces para eliminar todas o la mayoría de las secuencias codificantes de arilsulfatasa.

La modificación o inactivación de un gen hospedante tal como arilsulfatasa se puede realizar mediante técnicas antisentido bien consolidadas, usando una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica del gen. Más específicamente, la expresión del gen se puede reducir o eliminar introduciendo una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica, que se puede transcribir en la célula y es capaz de hibridarse al ARNm producido en la célula. De este modo, en condiciones que permiten que la secuencia nucleotídica antisentido complementaria se hibride al ARNm, se reduce o elimina la cantidad de proteína traducida. Los ejemplos para expresar un ARN antisentido se proporcionan por Ngiam et al. (Appl. Environ. Microbiol. 66:775-782, 2000) y Zrenner et al. (Planta 190:247-252, 1993).

La modificación, disminución o inactivación de un gen hospedante se puede obtener vía técnicas de interferencia de ARN (RNAi) (FEMS Microb. Lett. 237:317-324, 2004). Más específicamente, la expresión del gen mediante una célula fúngica filamentosa se puede reducir o eliminar clonando porciones sentido y antisentido idénticas de la secuencia nucleotídica, expresión que se va a efectuar, detrás de cada una con un espaciador nucleotídico entremedias, insertando en un vector de expresión e introduciendo el vector de expresión en la célula en la que el ARN bicatenario (dsRNA) se puede transcribir y después procesar a un siRNA más corto que es capaz de hibridarse a ARNm diana. Después de que se transcribe el dsRNA, la formación de pequeños fragmentos de siRNA nucleotídicos (21-23) conducirá a la degradación seleccionada del ARNm, que se va a efectuar. La eliminación del ARNm específico se puede hacer en diversos grados. Las técnicas de interferencia de ARN descritas en los documentos WO 2005/05672 y WO 2005/026356 se pueden usar para la modificación, disminución o inactivación del gen hospedante.

La cepa deficiente en arilsulfatasa, que se ha modificado o inactivado por cualquiera de los métodos descritos anteriormente y produce menor actividad de arilsulfatasa que la célula progenitora cuando se cultiva en condiciones idénticas según se mide usando los mismos ensayos como se definen anteriormente, puede poseer otra secuencia nucleotídica.

Tales cepas de producción industrial con actividad de arilsulfatasa disminuida, aisladas o construidas mediante técnicas genéticas clásicas o tecnología de ADN recombinante, se pueden usar para procedimientos industriales relevantes que requieren que el producto final carezca de un sabor rancio. Preferiblemente, estas cepas se usan para la producción de enzimas industrialmente relevantes. Más preferiblemente, estas cepas se usan para la producción de enzimas que se usan en la industria alimentaria, incluso más preferiblemente estas enzimas se usan en el procesamiento de productos lácteos. Muy preferiblemente, tales cepas de producción industrial con actividad de arilsulfatasa disminuida se usan para la producción de lactasa.

Cepas hospedantes

Las cepas hospedantes industriales adecuadas son preferiblemente microorganismos procariotas tales como bacterias, o más preferiblemente organismos eucariotas, por ejemplo hongos, tales como levaduras u hongos filamentosos, o células vegetales. Las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como hospedantes debido a su capacidad para segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como hospedantes son aquellas de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*. Una célula hospedante de levadura preferida para la expresión de una secuencia de ADN que codifica la enzima de interés es aquella del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Yarrowia*, o *Schizosaccharomyces*. Más preferiblemente, una célula hospedante de levadura se selecciona del grupo que consiste en la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (también conocida como *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*), *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, y *Schizosaccharomyces pombe*.

Las más preferidas para la expresión de la enzima son, sin embargo, células hospedantes fúngicas filamentosas. Las células hospedantes fúngicas filamentosas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Neurospora*, *Thermoascus*, *Myceliophthora*, *Sporotrichum*, *Thielavia*, y *Talaromyces*. Más preferiblemente, una célula hospedante fúngica filamentosa es de la especie *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* o *Aspergillus nidulans* o es de una especie del grupo de *Aspergillus niger* (como se define por Raper y Fennell, The Genus *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, p. 293-344, 1965). Éstas incluyen, pero no se limitan a, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubigenensis*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus ficuum*, y también aquellas de la especie *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium alabamense*, *Neurospora crassa*, *Myceliophthora thermophilum*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Disporotrichum dimorphosporum* y *Thielavia terrestris*.

Los ejemplos de cepas de producción industrial preferidas dentro del alcance de la presente invención son hongos tales como especies de *Aspergillus* (en particular aquellas descritas en los documentos EP-A-184.438 y EP-A-284.603) y especies de *Trichoderma*; bacterias tales como especies de *Bacillus* (en particular aquellas descritas en los documentos EP-A-134.048 y EP-A-253.455), especialmente *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, especies de *Pseudomonas*; y levaduras tales como las especies de *Kluyveromyces* (en particular aquellas descritas en el documento EP-A-096.430, tal como *Kluyveromyces lactis*, y en el documento EP-A-301.670) especies de *Saccharomyces*, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, o *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida utilis* o *Yarrowia lipolytica*. La actual invención se refiere muy preferiblemente a la producción de lactasa que carece de actividad de arilsulfatasa por *Kluyveromyces lactis*.

Se han aislado cepas deficientes en arilsulfatasa adecuadas para la producción de un polipéptido o enzima dados en un marco industrial, en el que sorprendentemente la cepa deficiente en arilsulfatasa produce al menos la misma cantidad de polipéptido o enzima que la cepa de tipo salvaje de la que originan, en las mismas condiciones de cultivo.

Preferiblemente, las cepas deficientes en arilsulfatasa son cepas que tienen menos de 50% de la actividad de arilsulfatasa intracelular o extracelular detectable, según se detecta en una reacción modelo (véase información experimental en el Ejemplo 2). Más preferiblemente, las cepas deficientes en arilsulfatasa son cepas que tienen menos del 50% de la actividad de arilsulfatasa intracelular. Más preferiblemente, las cepas deficientes en arilsulfatasa son cepas que tienen una actividad de arilsulfatasa intracelular, que es menor que 25% de la actividad de arilsulfatasa intracelular de la cepa de tipo salvaje de la que se originan, según se detecta en una reacción modelo, preferiblemente menor que 10%, más preferiblemente menor que 5%, más preferiblemente menor que 1%, y lo más preferible, la actividad de arilsulfatasa es indetectable en las cepas deficientes en arilsulfatasa.

En esta solicitud, la cepa CBS 2359 de *K. lactis* se toma como referencia de niveles de arilsulfatasa de tipo salvaje obtenibles en un cultivo de *K. lactis*, como una referencia del nivel de polipéptido de tipo salvaje obtenible en un cultivo de *K. lactis*, y como una referencia de actividad de arilsulfatasa intracelular obtenible en un cultivo de *K. lactis*. Las cepas de *K. lactis* deficientes en arilsulfatasa se definen como cepas que producen actividad de arilsulfatasa menor que la cepa CBS 2359 de *K. lactis* en las mismas condiciones de cultivo. Preferiblemente, la cepa deficiente en arilsulfatasa es una cepa de *K. lactis* que tiene menos del 50% de la actividad de arilsulfatasa intracelular de la cepa CBS 2359 de *K. lactis*, según se detecta en una reacción modelo. Más preferiblemente, las cepas de *K. lactis* deficientes en arilsulfatasa de la invención son cepas que tienen una actividad de arilsulfatasa intracelular que es menor que 25% de la actividad de arilsulfatasa intracelular de la cepa de *K. lactis* CBS 2359 de la que se originan, según se detecta en una reacción modelo, preferiblemente menor que 10%, preferiblemente menor que 5%, más preferiblemente menor que 1%, y lo más preferible, la actividad de arilsulfatasa es indetectable en las cepas de *K. lactis* deficientes en arilsulfatasa. Según una realización preferida de la invención, la cepa de *K. lactis* deficiente en arilsulfatasa usada se ha obtenido aplicando el método definido más tarde en esta solicitud.

La persona experta conoce una gran variedad de sistemas para la detección de un polipéptido. Los sistemas de detección incluyen cualquier ensayo posible para la detección de un polipéptido o de actividad enzimática. A título de ejemplo, estos sistemas de ensayo incluyen, pero no se limitan a, ensayos basados en ensayos colorimétricos, fotométricos, fluorométricos, turbidimétricos, viscosimétricos, inmunológicos, biológicos, cromatográficos, y otros ensayos disponibles.

Preferiblemente, si el polipéptido producido es una enzima, la cantidad de enzima activa producida se determina midiendo su actividad en una reacción modelo (véase el ejemplo 2).

5 La cepa deficiente en arilsulfatasa se puede caracterizar por el hecho de que, cuando esta cepa se ha transformado con un constructo de expresión que comprende un gen que codifica un polipéptido, dicha cepa produce al menos la cantidad del polipéptido que produciría la cepa de tipo salvaje de la que se origina en las mismas condiciones de cultivo, cuando la cepa de tipo salvaje también se ha transformado con el mismo constructo de expresión que la cepa deficiente en arilsulfatasa. Preferiblemente, las cepas deficientes en arilsulfatasa son cepas que producen la misma cantidad o más de un polipéptido dado que la cepa de tipo salvaje de la que se originan, en las mismas condiciones de cultivo. Más preferiblemente, la cepa deficiente en arilsulfatasa produce más de un polipéptido dado que la cepa de tipo salvaje de la que se origina, en las mismas condiciones de cultivo.

10 Producción de otros polipéptidos nativos u heterólogos y otras secuencias

Se describen aquí métodos para transcribir una secuencia nucleotídica en una célula hospedante, en los que la secuencia transcrita codifica un polipéptido deseado o es una molécula de ácido nucleico funcional, que comprenden:

- 15 (a) cultivar, en un medio nutriente, una célula hospedante que comprende (i) un promotor, (iv una secuencia nucleotídica en dirección 3' que codifica un polipéptido, (iii) una señal de para traduccional, y (iv) una señal de parada transcripcional,
- (b) expresar el polipéptido en la célula hospedante, y
- (c) opcionalmente, recuperar el polipéptido del medio nutriente o de la célula hospedante.

20 El polipéptido producido puede ser sensible a la degradación con proteasas. En este caso, se usará una célula hospedante mutante que es deficiente en proteasa. La cepa deficiente en arilsulfatasa se produce preferiblemente según el método de la presente invención. La cepa deficiente en arilsulfatasa se puede hacer crecer o se puede mantener en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido deseado usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden colocar sobre un sustrato sólido, se pueden agitar en un matraz, se pueden cultivar en fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, discontinua, discontinua alimentada, o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permiten que se exprese y/o aísle el polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, Bennett & LaSure, eds., *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales, o se pueden preparar usando composiciones publicadas (*por ejemplo*, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega al medio nutriente, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar de lisados celulares.

35 El polipéptido resultante se puede aislar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede aislar del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. El polipéptido aislado se puede purificar entonces adicionalmente mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (*por ejemplo*, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatoenfocado, o de exclusión de tamaños), electroforesis (*por ejemplo*, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (*por ejemplo*, precipitación con acetona o con sulfato de amonio), o extracción (*por ejemplo*, caotropo, sal, o pH). Véase, *por ejemplo*, Janson & Ryden, eds., *Protein Purification*, VCH Publishers, Nueva York, 1989.

45 El péptido se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para el polipéptido. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, la desaparición de un sustrato enzimático, o SDS-PAGE. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido. Los procedimientos para determinar la actividad enzimática son conocidos en la técnica para muchas enzimas.

50 El polipéptido puede ser cualquier polipéptido, ya sea nativo o heterólogo a la cepa deficiente en arilsulfatasa. La expresión "polipéptido heterólogo" se define aquí como un polipéptido que no es producido por una cepa de tipo salvaje. El término "polipéptido" no significa aquí que se refiere a una longitud específica del producto codificado, y por lo tanto engloba péptidos, oligopéptidos y proteínas. La secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo se puede obtener a partir de cualquier procarionta, eucariota, u otra fuente, y puede ser un gen sintético. La expresión "obtenido de", como se usa aquí en relación con una fuente dada, significará que el polipéptido es producido por la fuente o por una célula en la que se ha insertado un gen procedente de la fuente.

55 El polipéptido deseado puede ser un anticuerpo o una porción del mismo que se une a un antígeno, un antígeno, un factor de coagulación, una enzima, una hormona peptídica o su variante, un receptor o su porción de unión a ligando, una proteína reguladora, una proteína estructural, un informador, una proteína de transporte, una proteína

intracelular, una proteína implicada en un proceso secretor, una proteína implicada en un proceso de plegamiento, una chaperona, un transportador de aminoácidos peptídico, un factor de glucosilación, o un factor de transcripción. El polipéptido se puede segregar extracelularmente al medio de cultivo.

5 No hay limitación con respecto a la enzima específica. Las enzimas preferidas se describen en el resto de la memoria descriptiva y en los ejemplos.

10 Como alternativa, el polipéptido puede ser una proteína o enzima intracelular, tal como, por ejemplo, una chaperona, una proteasa, o un factor de transcripción. Un ejemplo de esto se describe por Punt et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:447-454, 1998). Esto se puede usar, por ejemplo, para mejorar la eficiencia de una célula hospedante como productora de proteína si se sabe que este polipéptido, tal como una chaperona, proteasa, o factor de transcripción, es un factor limitante en la producción de proteína.

15 Como se describe aquí, la cepa deficiente en arilsulfatasa también se puede usar para la producción recombinante de polipéptidos, que son nativos a la célula. Los polipéptidos nativos se pueden producir recombinantemente, *por ejemplo*, colocando un gen que codifica el polipéptido bajo el control de un promotor diferente para potenciar la expresión del polipéptido, para acelerar la exportación de un polipéptido nativo de interés fuera de la célula mediante el uso de una secuencia señal, o para incrementar el número de copias de un gen que codifica el polipéptido producido normalmente por la célula. La expresión "polipéptido heterólogo" engloba tal producción recombinante de polipéptidos nativos a la célula, hasta el grado de que tal expresión implica el uso de elementos genéticos no endógenos a la célula, o el uso de elementos de secuencias endógenas que se han manipulado para funcionar de manera que no se produzcan normalmente en la célula fúngica filamentosa. Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo son conocidas en la técnica, e incluyen el aislamiento a partir de ADN genómico, preparación a partir de ADNc, o una combinación de los mismos.

20 Como se describe aquí, los polipéptidos heterólogos también pueden incluir un polipéptido fusionado o híbrido, en el que otro polipéptido se fusiona al término N o al término C del polipéptido o su fragmento. Un polipéptido fusionado se produce fusionando una secuencia nucleotídica (o una porción de la misma) que codifica un polipéptido a una secuencia nucleotídica (o una porción de la misma) que codifica otro polipéptido.

25 Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de manera que estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor o promotores y terminador. Los polipéptidos híbridos pueden comprender una combinación de secuencias polipeptídicas parciales completas obtenidas de al menos dos polipéptidos diferentes, en los que uno o más pueden ser heterólogos a la célula fúngica mutante. Una secuencia nucleotídica aislada que codifica un polipéptido heterólogo de interés se puede manipular de muchas maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. Se entenderá que expresión incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, la transcripción, la modificación post-transcripcional, la traducción, la modificación post-traducciona, y la secreción. La manipulación de la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias nucleotídicas que utilizan métodos de clonación son bien conocidas en la técnica.

30 La secuencia de ADN que codifica el polipéptido a producir se puede enlazar operablemente a regiones reguladoras de ADN apropiadas para asegurar un nivel elevado de expresión de dicha secuencia de ADN, y preferiblemente un nivel elevado de secreción de dicho polipéptido. Si el polipéptido a producir es nativo a la cepa deficiente en arilsulfatasa, preferiblemente se usa su señal de secreción nativa. Como alternativa, si el polipéptido a producir no es nativo a la cepa deficiente en arilsulfatasa, preferiblemente se obtiene un constructo de fusión que comprende por ejemplo el gen de glucoamilasa de *Aspergillus niger* fusionado al gen heterólogo a producir. Se pueden usar las regiones reguladoras del gen de alfa amilasa de *Aspergillus oryzae*. Se pueden usar las regiones reguladoras del gen de glucoamilasa de *A. niger*. Según una realización preferida de la invención, se usan las regiones reguladoras del gen de lactasa de *K. lactis*. El constructo de ADN también puede comprender un marcador seleccionable. Como alternativa, el marcador seleccionable puede estar presente en un segundo constructo de ADN. A título de ejemplo, estos marcadores incluyen, pero no se limitan a, amdS (genes de acetamidasa), genes marcadores auxotróficos tales como argB, trpC, o pyrG, y genes de resistencia a antibióticos que proporcionan resistencia frente a, por ejemplo, bleomicina, higromicina B o G418. Preferiblemente, el gen marcador es un gen de acetamidasa procedente de *Aspergillus nidulans*. Más preferiblemente, el gen de acetamidasa procedente de *Aspergillus nidulans* se fusiona al promotor gpdA. Más preferiblemente, el gen de acetamidasa procedente de *Aspergillus nidulans* se fusiona al promotor ADH1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

35 Se desarrolló un método para obtener cepa deficiente en arilsulfatasa que es adecuado para producir grandes cantidades de un polipéptido y que se puede usar como productores de polipéptido en un marco industrial. El polipéptido puede ser homólogo o heterólogo para dicha cepa deficiente en arilsulfatasa. En el caso de un polipéptido o enzima heterólogos, la cepa de tipo salvaje sobre la que se aplica tal método se puede haber transformado previamente para expresar un gen que codifica tal polipéptido o enzima como ya se ha descrito previamente en la descripción. Tales cepas deficientes en arilsulfatasa producen al menos la cantidad de polipéptido que producen las cepas de tipo salvaje de las que se origina, en las mismas condiciones de cultivo. Como

alternativa, la construcción de la cepa deficiente en arilsulfatasa se puede realizar antes de la transformación con un gen que codifica tal polipéptido o enzima como ya se ha descrito previamente en la descripción.

Como se describe aquí, los polipéptidos son producidos consiguientemente en una célula hospedante de la presente invención con un fenotipo de arilsulfatasa reducido, célula la cual es un mutante de una célula progenitora útil para la producción de enzimas útiles en la industria alimentaria, en el que la célula progenitora comprende una o más secuencias nucleotídicas que codifican arilsulfatasas, y la célula mutante produce menos actividad de arilsulfatasa que la célula progenitora cuando se cultivan en las mismas condiciones.

Las características preferidas descritas para un aspecto de la invención también son aplicables a otros aspectos de la invención.

La invención se elucidará ahora con referencia a los siguientes ejemplos sin embargo estar limitados a ellos.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Clonación del flanco 5' del gen de arilsulfatasa de *K. lactis* en el vector TOPO

Figura 2: Clonación del flanco 3' del gen de arilsulfatasa de *K. lactis* en el vector TOPO

Figura 3: Clonación del flanco 3' del gen de arilsulfatasa de *K. lactis*, que carece del sitio SacII, en el vector TOPO

Figura 4: Combinación del flanco 5' y del casete de selección amdS en un plásmido

Figura 5: Combinación del flanco 5', del flanco 3' y del casete de selección amdS en un plásmido

Figura 6: Construcción final del constructo genosuprimido para arilsulfatasa

Figura 7: Muestra el perfil de endoproteasas usando como sustrato Dabcyl-Edans

Materiales y Métodos

Ensayo de actividad de arilsulfatasa: La actividad de arilsulfatasa se determinó usando como sustrato sulfato de p-nitrofenilo (obtenido de Sigma). Para las medidas de la actividad, se mezclaron 0,5 ml de disolución de sustrato (20 mM de sulfato de p-nitrofenilo en 100 mM de tampón NaP_i pH 6,5) con 0,5 ml de disolución de muestra que comprende la actividad de arilsulfatasa. La disolución se incubó a 37°C durante 3 horas. Después, la reacción se detuvo añadiendo 1,5 ml de NaOH 0,5 M. La OD a 410 nm se determinó (longitud de recorrido 1 cm) frente a un experimento en blanco en el que se añade agua en lugar de disolución de muestra. Como referencia, se preparó una disolución en la que la enzima se añadió después de que la reacción se detuvo con NaOH. La OD₄₁₀ de esta disolución de referencia se restó de la OD₄₁₀ determinada para la disolución en la que la enzima fue activa durante tres horas. Una unidad de arilsulfatasa (ASU) se expresa como el cambio en OD₄₁₀*10E6/h. Para productos líquidos, la actividad de arilsulfatasa se puede expresar como el cambio en OD₄₁₀*10E6/h por ml de producto. Para productos sólidos, la actividad de arilsulfatasa se puede expresar como el cambio en OD₄₁₀*10E6/h por g de producto. Cuando se conoce la actividad de la enzima de interés, la actividad de arilsulfatasa también se puede expresar como el cambio en OD₄₁₀*10E6/h por unidad de actividad de enzima de interés.

Ensayo de actividad de lactasa ácida: Se incubó lactasa ácida durante 15 minutos con o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (Fluka 73660) a pH 4,5 y 37 grados C para generar o-nitrofenol. La incubación se detuvo añadiendo carbonato de sodio al 10%. La extinción del o-nitrofenol generado se mide a una longitud de onda de 420 nm, y cuantifica la actividad de la lactasa ácida. Una unidad de lactasa ácida (ALU) es la cantidad de enzima que, en las condiciones de ensayo, genera 1 micromol de o-nitrofenol por minuto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Identificación de compuestos productores de sabor rancio en leche UHT

Se añadió Maxilact LG5000 (DSM, Países Bajos) en condiciones estériles a leche UHT semidesnatada (Frische Vlag, Países Bajos) hasta niveles de 10.000 y 40.000 NLU por litro, y se incubó durante 4 días a temperatura ambiente. En el experimento de referencia, no se añadió Maxilact. Antes de la evaluación de las muestras mediante un panel de gusto, se preparó una muestra de leche hidrolizada con lactasa reciente añadiendo 40.000 NLU por litro de leche semidesnatada, y se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente. El análisis de las muestras se llevó a cabo en NIZO Food Research (Países Bajos) usando el procedimiento SOIR, que es un procedimiento habitual en el NIZO Food Research y que incluye un análisis sensorial y químico. El análisis sensorial se realizó directamente en las muestras preparadas, y se congelaron alícuotas de cada muestra de leche a -25°C en pequeñas porciones para el análisis químico posterior.

El análisis sensorial se realizó por un panel entrenado de 9 miembros. La muestra de referencia se describió como cocida, y las otras muestras se clasificaron como leches UHT no estándar. Los atributos principales que describieron el sabor rancio fueron químico, medicinal, orina/no limpio y establo/estércol.

Se aislaron los compuestos volátiles con una destilación a alto vacío simultánea próxima a la temperatura ambiente, creando un extracto acuoso de la muestra. Los compuestos volátiles se aislaron subsiguientemente del extracto acuoso usando un espacio de cabeza dinámico, y se recogieron en un absorbente. Los compuestos aislados se inyectaron en un cromatógrafo de gases haciendo uso de una desorción térmica, y se separaron en una columna de GC. El efluente de GC se evaluó por dos evaluadores entrenados (GC-sniff), y se describió en términos del olor (olfatometría). Se llevaron a cabo análisis de GC-Sniff duplicados muy concentrados y poco concentrados usando dos tiempos de purga diferentes (30 minutos y 24 horas) durante la toma de muestras del espacio de cabeza dinámico. Subsiguientemente, los picos (compuestos) indicados durante el análisis de olfatometría como correspondientes a las características del sabor rancio de las muestras UHT tratadas con lactasa se identificaron mediante espectrometría de masas. Los compuestos de interés que pueden explicar la causa del sabor rancio se identificaron como 1) ésteres (butanoato de etilo); 2) compuestos azufrados (sulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo y benzotiazol); 3) ésteres de azufre (tioacetato de metilo, tiobutirato de metilo); 4) 1-octen-3-ol; 5) 2-nonenal; 6) β -damascenona; 7) borneol y 8) p-cresol. El p-cresol se pudo originar de conjugados en la leche. El único compuesto que se asoció con el atributo sensorial más agresivo "medicinal" fue p-cresol. La concentración de p-cresol en las muestras se determinó usando análisis mediante GC mediante adición de cantidades estándar de p-cresol a las muestras. La concentración de p-cresol en la muestra de leche UHT (incubación durante 4 días) se estimó a 12 μg por litro. Esto está claramente por encima del umbral de sabor de 1 ppb y 2 ppb para el aire y el agua, respectivamente (Ha et al, (1991) J Dairy Sci 74, 3267-3274). También está en el intervalo de concentraciones de p-cresol encontradas habitualmente en leche de vacas. Los resultados se confirmaron mediante experimentos de recombinación en leche, confirmando que p-cresol es responsable del sabor rancio medicinal en leche UHT tratada con lactasa.

Ejemplo 2

Determinación de la actividad de aril-sulfatasa y de β -galactosidasa.

La actividad de arilsulfatasa se determinó usando sulfato de p-nitrofenilo (obtenido de Sigma) como sustrato. Para las medidas de actividad, se mezclaron 0,5 ml de disolución de sustrato (20 mM de sulfato de p-nitrofenilo en 100 mM de tampón NaP_i pH 6,5) con 0,5 ml de disolución de muestra que contiene la actividad de arilsulfatasa. La disolución se incubó a 37°C durante 3 horas. Después, la reacción se detuvo mediante adición de 1,5 ml de NaOH 0,5M. La OD a 410 nm se determinó (longitud de recorrido 1 cm) frente a un experimento en blanco en el que se añade agua en lugar de disolución de muestra. Como referencia, se preparó una disolución en la que la enzima se añadió después de que la reacción se detuvo con NaOH. La OD₄₁₀ de esta disolución de referencia se restó de la OD₄₁₀ determinada para la disolución en la que la enzima fue activa durante tres horas. La actividad de sulfatasa se expresa como el cambio en OD₄₁₀*10E6/h y por NLU. La actividad de lactasa (NLU) para la disolución de muestra se determinó como se da más abajo.

La actividad de lactasa se determinó como unidades de lactasa neutra (NLU) usando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato, según el procedimiento descrito en FCC (cuarta ed., julio de 1996, p. 801-802: Lactase (neutral) β -galactosidase activity).

Ejemplo 3

Adición de aril-sulfatasa a leche UHT

El ensayo de sabor rancio en la leche se realizó con arilsulfatasa comercialmente disponible (Sigma, Aerobacter aerogenes, tipo VI; 4,9 mg de proteína/ml; 3,9 unidades de arilsulfatasa como se define mediante Sigma/mg de proteína). En el experimento, se incubaron 50 ml de leche UHT (Campina, Países Bajos) con 1 ml de disolución enzimática a 30°C. El desarrollo del sabor rancio fue seguido mediante aspiración de la muestra. El olor rancio típico que también se describió en el ejemplo 1 para la leche UHT incubada con lactasa fue claramente perceptible después de 2 horas de incubación. El olor fue más intenso después de 17 horas de incubación. Aparentemente, la aril-sulfatasa generó un sabor rancio similar que la lactasa. Basándose en los hallazgos, descritos en el ejemplo 1, esto se puede explicar por la liberación de p-cresol a partir del conjugado sulfato de p-cresilo en la leche. También se realizaron experimentos en los que se añadieron fosfatasa ácida (germen de trigo, Sigma, 6 unidades de fosfatasa como se define por Sigma en 40 ml de leche) o glucuronidasa (procedente de E. coli, Sigma, 6350 unidades de glucuronidasa como se define por Sigma por 40 ml de leche) en lugar de arilsulfatasa. En estas incubaciones, no se desarrolló el sabor rancio típico. Esto sugiere que los conjugados de sulfato son los conjugados más importantes para la formación del sabor rancio en leche de vacas. Esto es consistente con los hallazgos de la bibliografía (Lopez et al (1993) J Agric Food Chem. 41, 446-454). Los resultados no excluyen completamente la presencia de otros compuestos de sabor rancio, que se podrían generar por glucuronidasa o fosfatasa ácida, pero aparentemente estos compuestos no alcanzan los niveles que son mayores que los umbrales de sabor.

Ejemplo 4

Ensayo de sabor rancio de leche UHT: procedimiento

Se incubó leche UHT semidesnatada (Campina, Países bajos) con 20.000 NLU/l de leche durante 48 horas a 30°C. La lactasa se añadió vía un filtro estéril en condiciones estériles para evitar la infección bacteriana. La leche se probó después de 48 horas por un panel entrenado del gusto y se comparó con la disolución de leche que se incubó en condiciones idénticas pero sin la adición de lactasa. Se preparó una disolución de referencia brevemente antes de la prueba del gusto añadiendo 5000 NLU/l de leche e incubando durante 2 horas a 30°C. Esta leche dulce se usó como la disolución de referencia por el panel del gusto. El sabor rancio se puntuó por el panel según lo siguiente: la leche en blanco se estableció como "-". A los productos con un bajo sabor rancio que contienen un sabor rancio perceptible pero ligero se les da "+", mientras que los productos que contienen mayores cantidades de sabor rancio se expresan como "++" o "+++". La indicación "+++" indica un nivel elevado de sabor rancio, percibido como muy desagradable. Los términos usados para caracterizar el sabor rancio fueron los mismos que los descritos en el ejemplo 1.

Ejemplo 5

Purificación de lactasa de *K. lactis*: eliminación de actividad de aril-sulfatasa.

Se diluyó Maxilact LX5000 (DSM, Países Bajos), una lactasa de *K. lactis* comercialmente disponible, 10 veces con agua y se aplicó a una columna de Q-sefarosa (Amersham Biosciences), equilibrada en 55 mM de KP_i (pH 7,0). La carga se continuó hasta que se detectó la actividad de lactasa en el paso de la columna. La columna se lavó subsiguientemente con 4 volúmenes de columna de 55 mM de KP_i (pH 7,0), seguido de la elución de lactasa con 65 mM de KP_i (pH 7,0) que contiene NaCl 0,16 M. Las fracciones se recogieron y se evaluaron para determinar la actividad de lactasa. Las fracciones que contienen lactasa se reunieron, y se cargaron en una columna de butil-Sefarosa (Amersham Biosciences), equilibrada en 55 mM de KP_i (pH 7,) que contiene $NaSO_4$ 1M. La lactasa se aplicó a la columna en presencia de $NaSO_4$ 1M (pH 7,0) hasta que se detectó la lactasa en el paso de la columna. La columna se lavó con 4 volúmenes de columna de 55 mM de KP_i (pH 7,) que contiene $NaSO_4$ 1M. La lactasa se eluyó usando 15 volúmenes de columna de un gradiente lineal desde 55 mM de KP_i (pH 7,0) que contiene $NaSO_4$ 1M hasta 55 mM de KP_i (pH 7,0). El perfil de elución se monitorizó mediante detección con UV (280 nm). Las fracciones se recogieron y se evaluaron para determinar la actividad de lactasa. Se reunieron las fracciones que contienen lactasa, con omisión de aquellas fracciones que se recogieron después de que el pico de lactasa (OD 280 nm) hubo disminuido hasta 50% del valor del pico máximo. La omisión de estas fracciones es crítica para evitar contaminación de la preparación de lactasa con arilsulfatasa. La elución de lactasa solapa parcialmente con la elución de arilsulfatasa. El producto se concentró y se desaló mediante ultrafiltración en un filtro de 10 kdalton, y se conservó mediante adición de glicerol a 50% p/p.

Ejemplo 6

Niveles de proteasa en lactasa purificada

La actividad de proteasa se determinó usando una serie de sustratos con la fórmula general Glu(EDANS)-Ala-Ala-Xxx-Ala-Ala-Lys(DABCYL). (Xxx: cualquiera de los 20 aminoácidos naturales). Los sustratos se obtuvieron de PEPSCAN (Lelystad, Países Bajos), y son sustratos fluorescentes internamente desactivados. Cuando tales sustratos peptídicos se escinden, esto da como resultado una señal fluorescente. Por lo tanto, la aparición de fluorescencia señala la presencia de actividad de endoproteasa. La actividad de endoproteasa se determinó en placas de microtitulación de 96 pocillos añadiendo 50 μ l de disolución enzimática a 200 μ l de disolución que contiene 50 μ M del sustrato en 100 mM de Tris-Bis (pH 6,7). La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 40°C en un lector de placas de microtitulación TECAN Genius usando un software Magellan4. El desarrollo de fluorescencia fue seguido en el tiempo (filtro de excitación: 340 nm, filtro de emisión: 492 nm). La actividad de proteasa se cuantificó como la pendiente de la recta de fluorescencia, expresada como RFU/minuto/NLU. (RFU: unidades fluorescentes relativas, como se da por el equipo de Genius). Las unidades NLU de la muestra enzimática se determinan como se da en el ejemplo 2. La Figura 7 muestra la enorme reducción en la actividad de proteasa cuando LX5000 se purifica sobre la columna de Q-Sefarosa. Las fracciones reunidas tras Q-sefarosa (ejemplo 4) tienen un factor de al menos 5-10 veces menos de actividad de proteasa en comparación con el material de partida (LX5000). Las muestras de lactasa en las que RFU/min./NLU es <0,5 para cada uno de los sustratos usados (véase la fig. 1) se definen como preparaciones que tienen niveles bajos de actividad de proteasa.

Ejemplo 7

Comparación de lactasa no purificada y purificada

Varias preparaciones de lactasa se sometieron al ensayo de sabor rancio que se describe en el ejemplo 4. Las preparaciones de lactasa difirieron en el contenido de aril-sulfatasa. Para cada preparación, se usaron al menos dos muestras; las muestras individuales variaron en actividad de aril-sulfatasa, y los intervalos de actividad se indican en la columna derecha de la tabla 1. Los resultados del ensayo de sabor rancio se dan en la tabla 1. Claramente, los niveles de actividad de arilsulfatasa están correlacionados con la formación del sabor rancio. Niveles bajos de aril-sulfatasa (19 o menos, véase la tabla 1) no provocan la formación de sabor rancio, mientras que mayores niveles

conducen a una mayor formación de sabor rancio. También está claro que la preparación de lactasa tras Q-Sefarosa todavía muestra desarrollo de sabor rancio, incluso aunque los niveles de proteasa son bajos (véase el ejemplo 5).

5 Tabla 1: Desarrollo de sabor rancio para diversas preparaciones de lactasa. 1: Fracción con elevada actividad de aril-sulfatasa, seleccionada de las fracciones de elución de Q-Sefarosa descritas en el ejemplo 4. 2: el nivel de 8 unidades de arilsulfatasa (como se define en el ejemplo 2) es el límite de detección del ensayo. <8 significa que no se observó actividad de arilsulfatasa.

Preparación de lactasa	Nivel de formación de sabor rancio	Actividad de arilsulfatasa en preparación delta OD * 10E6/h por NLU
Leche sin adición	-	0
Lactasa después de Q-Sefarosa (fracciones reunidas; ejemplo 4)	+ a ++	100-300
Lactasa GODO YNL-2 (GODO, Japón)	+	40-120
Lactasa después de butil-Sefarosa (fracciones reunidas; ejemplo 4)	-	<8 - 19 ²
Lactasa con alto contenido en arilsulfatasa ¹	+++	723

Ejemplo 8

Diferentes preparaciones enzimáticas comerciales contienen actividad de arilsulfatasa

10 Diversos productos enzimáticos producidos a partir de diferentes fuentes y recuperados mediante diferentes rutas de procesamiento se recogieron y se analizaron en busca de la actividad de arilsulfatasa usando el ensayo especificado en la sección de Materiales y Métodos. A partir de los resultados obtenidos (véase la Tabla 2), está claro que las preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de diversos microorganismos, tales como *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*, *Rhizomucor miehei*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma harzianum*, pueden contaminarse seriamente con actividad de arilsulfatasa.

15

Estas preparaciones enzimáticas se pueden purificar ventajosamente mediante el procedimiento según la invención.

Tabla 2. Actividad de arilsulfatasa en diversas preparaciones enzimáticas comerciales

Producto enzimático	Proveedor	Código del lote	Organismo prod.	Actividad de arilsulfatasa (en delta OD * 10E6/h por g o ml de preparación enzimática)
Sumizyme FP (proteasas microbianas)	Shin-Nihon	U-ES29 (chem syst.)	<i>A. oryzae</i>	39300*10E3 U/g
Sumizyme LP (proteasas microbianas)	Shin-Nihon	S-9906-02	<i>A. oryzae</i>	14950*10E3 U/g
Maxilact LG2000	DSM	AE0050	<i>K. lactis</i>	283*10E3 U/ml
lactasa ácida	Amano	LAFD10505 08 (20 mg)* 3.3 h reaction	<i>A. oryzae</i>	12550*10E3 U/g
Lipase F-AP15 (lipasas)	Amano	LFB 1251507	<i>A. oryzae</i>	1230*10E3 U/g
Piccantase (esterasa/lipasa microbiana)	DSM	F5583 (20 mg)	<i>R. miehei</i>	250*10E3 U/g
Filtrase BR-X β-glucanase (hemicelulasas microbianas)	DSM	AF0392	<i>T. emmersonii</i>	513*10E3 U/ml

Producto enzimático	Proveedor	Código del lote	Organismo prod.	Actividad de arilsulfatasa (en delta OD * 10E6/h por g o ml de preparación enzimática)
Oenzyme Elevage β -glucanase (hemicelulasas microbianas)	DSM	KM616001	<i>T. harzianum</i>	1985*10E3 U/g

EJEMPLOS 9-10

5 En los ejemplos descritos aquí más abajo, se realizaron técnicas estándar de clonación molecular, tales como aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, electroforesis de ácidos nucleicos, modificación enzimática, escisión y/o amplificación de ácidos nucleicos, transformación de *E. coli*, etc., como se describe en la bibliografía (Sambrook et al. (2000) "Molecular Cloning: a laboratory manual", tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York, e Innis et al. (eds.) (1990) "PCR protocols, a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego).

Ejemplo 9

10 Construcción de una cepa genosuprimida para arilsulfatasa de *Kluyveromyces lactis*

Aislamiento de ADN cromosómico de *Kluyveromyces lactis*

15 Un matraz de agitación de 100 ml con YEPD (1% de extracto de levadura; 1% de bacto-peptona; 2% de glucosa) se inoculó con una única colonia de *K. lactis* CBS 2359 y se cultivó durante 24 horas a 30°C agitando a 280 rpm. La cantidad de células se contó usando una cámara de recuento, y se usó una cantidad de cultivo que corresponde a $4,1 \cdot 10^8$ células. La extracción del ADN cromosómico se realizó usando el Fast DNA Spin Kit suministrado por Q-BIOgene (nº de Catálogo 6540-600). Se usó el protocolo de levadura: se usó una etapa de homogeneización que usa el homogeneizador Fastprep FP120 (BIO101 Savant) de 40 segundos al ajuste de velocidad 6,0. Subsiguientemente, la muestra se enfrió en hielo y se homogeneizó subsiguientemente de nuevo usando las mismas condiciones.

20 La pureza y el rendimiento del ADN genómico extraído se determinó usando el espectrofotómetro Nanodrop ND1000. Se encontró que la concentración del extracto fue 114 nanogramos/microlitro. Se encontró que la relación A260/280 y A260/230 fueron respectivamente 1,57 y 0,77.

Amplificación mediante PCR de los flancos 5' y 3' de arilsulfatasa:

cebadores de arilsulfatasa del flanco 5':

25 DFS-15289 (5'→3'): TCG CCG CGG TTG TCA ACT ATA TTA ACT ATG

DFS-15290 (5'→3'): GAT AGA TCA TAG AGT AAC AAT TGG

arilsulfatasa del flanco 3':

DFS-15291 (5'→3'): GCA ACT GAA GGT GGT ATC AAT TG

DFS-15292 (5'→3'): CAC CCG CGG CAC CAG ATA ATG GAG GTA G

30 arilsulfatasa SacII del flanco 3':

DFS-15291 (5'→3'): GCA ACT GAA GGT GGT ATC AAT TG

DFS-15340 (5'→3'): CGG CAC CAG ATA ATG GAG GT

35 Los flancos de arilsulfatasa se amplificaron usando Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, (Finnzymes, Espoo Finlandia). El AND genómico de *K. lactis* CBS 2359 se diluyó 100 veces con agua Milli-Q, y se usaron 5 μ l como molde en una mezcla de PCR de 50 μ l, según las instrucciones de los proveedores. Un bloque Hybaid MBS 0.2G PCR usa los siguientes programas:

Programa de PCR arilsulfatasa flanco 5':

Etapa 1 (1 ciclo) 98°C 30 s

Etapa 2 (30 ciclos) 98°C 10 s

ES 2 454 167 T3

	60°C	30 s
	72°C	30 s
Etapa 3 (1 ciclo) 72°C	10 min	
	4°C	Mantener
Programa de PCR arilsulfatasa flanco 3':		
Etapa 1 (1 ciclo) 98°C	30 s	
Etapa 2 (30 ciclos) 98°C	10 s	
	72°C	30 s
	72°C	30 s
Etapa 3 (1 ciclo) 72°C	10 min	
	4°C	Mantener
Programa de PCR arilsulfatasa SaclI ⁻ flanco 3':		
Etapa 1 (1 ciclo) 98°C	30 s	
Etapa 2 (30 ciclos) 98°C	10 s	
	65°C	30 s
	72°C	30 s
Etapa 3 (1 ciclo) 72°C	10 min	
	4°C	Mantener

Construcción de un vector genosuprimido de arilsulfatasa:

5 Los fragmentos de PCR de los flancos 5', 3', y SaclI⁻ arilsulfatasa 3' se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO (Invitrogen; número de Parte 45-0245), según las instrucciones del proveedor. Las reacciones de clonación de TOPO se transformaron a One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen; número de parte 44-0301) según las instrucciones del proveedor. Los clones correctos se seleccionaron basándose en el análisis del patrón de restricción usando *MunI*, *SacI*, *XcmI*, y *DraI*; *MunI*, *SacI*, *EcoRI* y *EcoRV*; *MunI*, *EcoRI*, *EcoRV* y *SacI* para respectivamente, 5' TOPO, 3' TOPO y 3' SaclI TOPO.

10 El casete *amdS* se aisló del vector pKLAC1 (New England Biolabs). El plásmido pKLAC1 se transformó a células de *dam-lacM-E. coli* químicamente competentes (New England Biolabs; Número de Catálogo C2925H), y se aisló el plásmido sin metilar.

Los lotes de ADN plasmídico grandes de 5' TOPO, 3' TOPO, 3' SaclI-TOPO y del vector pKLAC1 se aislaron de cultivos LBC nocturnos que contienen 50 µg/ml kanamicina usando el kit GeneElute Plasmid MidiPrep (Sigma; Número de Catálogo NA0200).

15 El vector pKLAC1 se digirió con *SalI* y *XbaI* y el vector 5' TOPO se digirió con *XbaI* y *XhoI*. Las digestiones se purificaron usando el kit Nucleospin ExtractII (Machery Nagel) según las instrucciones del proveedor.

20 El casete *amdS* digerido con *SalI/XbaI* se ligó en el vector 5' TOPO digerido con *XbaI/XhoI* usando el kit de ligación Quick (New England Biolabs; Número de Catálogo M2200S) según las instrucciones del proveedor. La mezcla de ligación se transformó a One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen; número de parte 44-0301) según las instrucciones del proveedor. Se seleccionó un clon correcto basándose en el análisis del patrón de restricción usando *MunI*, *EcoRI* y *SacI*. Esto dio como resultado el siguiente vector: vector 5'*amdS* TOPO (Figura 1).

25 Se aisló un gran lote del plásmido 5'*amdS* TOPO de cultivos LBC nocturnos que contienen 50 µg/ml de kanamicina usando el kit GeneElute Plasmid MidiPrep Kit (Sigma; Número de Catálogo NA0200) según las instrucciones del proveedor. El vector 5'*amdS* TOPO se digirió con *MunI* y *AsclI*, y el vector 3' SaclI⁻ TOPO se digirió con *MunI* y *EcoRI*.

El fragmento *MunI/EcoRI* 3' SaclI⁻ TOPO se aisló y purificó por medio de extracción en gel. Se realizó una

electroforesis en 1% de agarosa en tampón de TAE que contiene SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen; Número de Catálogo S33102), según las instrucciones del proveedor. El fragmento se visualizó usando el transiluminador lector en la oscuridad (Clare Chemical Research; Número de Catálogo DR-45M), se cortó del gel y se extrajo de la agarosa usando el kit Nucleospin ExtractII (Machery. Nagel; Número de Catálogo 740 609.250) según el protocolo de extracción en gel del proveedor.

El vector 5'amdS TOPO se digirió con *MunI* y con *Ascl*, y se purificó usando el kit Nucleospin ExtractII (Machery Nagel) según el protocolo de purificación de PCR del proveedor. Subsiguientemente, el vector 5'amdS TOPO digerido con *MunI*/*Acl* se desfosforiló usando fosfatasa alcalina de gamba (Roche; Número de Catálogo 1.758.250) según las instrucciones del proveedor.

El fragmento *MunI*/*EcoRI* 3' *SacII* TOPO se ligó al vector 5' amdS TOPO digerido con *MunI*/*Ascl* desfosforilado usando el kit de ligación Quick (New England Biolabs; Número de Catálogo M2200S) según las instrucciones del proveedor. La mezcla de ligación se transformó a células químicamente competentes *dam-Idcm-E. coli* (New England Biolabs; Número de Catálogo C2925H) según las instrucciones del proveedor. Se seleccionó un clon correcto basándose en el análisis del patrón de restricción usando *EcoRI* y *EcoRV*. Esto dio como resultado el siguiente vector: vector 5' amdS 3' *SacII* TOPO.

Se aisló un gran lote de vector 5' *amdS* 3' *SacII* TOPO de cultivos LBC nocturnos que contienen 50 µg/ml de kanamicina usando el kit GeneElute Plasmid MidiPrep Kit (Sigma; Número de Catálogo NA0200) según las instrucciones del proveedor.

El vector 5'amdS 3'*SacII* se digirió con *XbaI*. El vector 3' TOPO se digirió con *XbaI* y *SpeI*. Las digestiones se purificaron usando el kit Nucleospin ExtractII Kit (Machery Nagel) según las instrucciones del proveedor. El fragmento *XbaI*/*SpeI* 3' TOPO se aisló por medio de extracción en gel, como se describe anteriormente. El vector 5'amdS 3'*SacII* digerido con *XbaI* se desfosforiló usando fosfatasa alcalina de gamba, Roche (Número de Catálogo 1.758.250), según las instrucciones del proveedor. El fragmento *XbaI*/*SpeI* 3' se ligó en el vector 5' amdS 3' *SacII* digerido con *XbaI* desfosforilado usando el kit de ligación Quick (New England Biolabs; Número de Catálogo M2200S) según las instrucciones del proveedor. La mezcla de ligación se transformó a One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen; número de parte 44-0301). Se seleccionó un clon correcto basándose en el análisis del patrón de restricción usando *MfeI*, *KpnI*, *EcoRI*, *SacII*, *Scal*. Esto dio como resultado el vector genosuprimido de arilsulfatasa de *K. lactis* final (figura 3).

Se aisló un gran lote del vector genosuprimido de arilsulfatasa de cultivos LBC nocturnos que contienen 50 µg/ml de kanamicina usando el kit GeneElute Plasmid MidiPrep Kit (Sigma; Número de Catálogo NA0200) según las instrucciones del proveedor. El vector genosuprimido de arilsulfatasa de *K. lactis* se digirió con *SacII*, de manera que se obtendría el casete genosuprimido lineal, que carece de la parte del vector TOPO. La digestión se purificó usando el kit Nucleospin ExtractII Kit (Machery Nagel) según las instrucciones del proveedor.

Transformación de *K. lactis* CBS 2359 con vector genosuprimido de arilsulfatasa

Se incubó un cultivo de 100 ml de YEPD de *K. lactis* CBS2359 a 30°C, agitando a 280 rpm durante 24 horas. Este cultivo se usó para inocular un cultivo de 100 ml de YEPD que se hizo crecer en las mismas condiciones hasta que se alcanzó una OD₆₁₀ entre 0,5 y 0,8.

Las células se cosecharon por medio de centrifugación durante 5 minutos a 1559 g y 4°C. El pelete celular se lavó con 50 ml de tampón de electroporación (EB) estéril: 10 mM de Tris pH 7,5, 9,2% (p/v) de sacarosa, 1 mM de MgCl₂ a 4°C. El pelete celular se resuspendió en 50 ml de YEPD que contiene 25 mM de DTT y 20 mM de tampón de HEPES pH 8,0 a temperatura ambiente. Las células se incubaron 30 minutos a 30°C sin agitación. Las células se cosecharon por medio de centrifugación durante 5 minutos a 1559 g y 4°C, y se lavaron con 10 ml de EB enfriado con hielo. Las células se peletizaron nuevamente por medio de centrifugación durante 5 minutos a 1559 g y 4°C, y se resuspendieron en 0,1 ml de EB enfriado con hielo. La suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 40 microlitros en tubos eppendorf de 1,5 ml. A una alícuota de células, se añadieron 0,2-1,0 microgramos (1-5 microlitros) del constructo genosuprimido lineal, se mezcló pipeteando, y se incubó en hielo durante 15 minutos. La mezcla de célula y ADN se añadió a una cubeta de electroporación congelada con un tamaño de espacio de 2 mm (BTX; número de parte 45-0125). La electroporación se llevó a cabo en un electroporador BioRad compuesto de un Gene Pulser (BioRad, Modelo número 1652077) y un Pulse Controller (BioRad, Modelo número: 1652098) usando los siguientes ajustes: 1000 V, 400 Ohm y 25 µF. Inmediatamente tras la electroporación, se añadió 1 ml de YEPD, y las células se transfirieron a un tubo estéril de 12 ml y se incubaron durante 2 horas en una incubadora de agitación a 30°C. Las células se peletizaron durante 5 minutos a 1559 g, y se lavaron en disolución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,85% (p/v)). Las células se peletizaron nuevamente y se resuspendieron en 1 ml de disolución salina fisiológica. Se colocaron en placas varias alícuotas de 25 µl, 50 µl y 100 µl sobre placas de agar amdS selectivas: 1,25% (p/v) de agar, 1,17% (p/v) de base de carbono de levadura, 30 mM de tampón de fosfato pH 6,8, y 5 mM de acetamida. Las placas se incubaron durante 2 días a 30°C, seguido de una incubación de 2 días a temperatura ambiente. Las colonias se seleccionaron y purificaron rallándolas en placas de agar YEPD, de manera que aparecieran colonias individuales, y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Estas colonias individuales se ensayaron para la integración dirigida del constructo genosuprimido usando una PCR de colonia con oligonucleótidos dirigidos

5 contra el casete amdS y en dirección 3' del constructo genosuprimido integrado. El material de colonia se suspendió en 20 mM de NaOH, 0,2% (p/v) y se incubó durante 5' a 98°C. La suspensión celular se diluyó 2 veces con agua, y se usaron 2,5 microlitros directamente como molde en una reacción de PCR de 25 microlitros usando Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes; Espoo Finlandia; código del producto F-530S) según las instrucciones del proveedor.

Directo 3' amdS: GAC AAT TGA TAC CAC CTT CAG TTG

Inverso en dirección 3': CTG GGA AAT GTG GTG ACT CCA TA

Programa dirigido a PCR:

Etapa 1 (1 ciclo)	98°C	30 s
Etapa 2 (30 ciclos)	98°C	10 s
	68°C	30 s
	72°C	30 s
Etapa 3 (1 ciclo)	72°C	10 min
	4°C	Mantener

10 La PCR se analizó en geles de agarosa al 1%, y se seleccionaron los transformantes deseados que muestran una banda amplificada clara. Las cepas genosuprimidas de arilsulfatasa se denominan 2359 Δ ARY1-10, y se almacenaron hasta un uso posterior.

Ejemplo 10

Detección de actividad de arilsulfatasa en 2359 Δ ARY

15 La cepa madre CBS 2359 y la cepa 2359 Δ ARY se cultivaron todas ellas en un matraz de agitación en 100 ml de YEP + 2% de galactosa durante 3 días a 30°C. La biomasa se recogió mediante centrifugación durante 5 minutos a 1559 g y 4°C. La biomasa se lavó dos veces con agua enfriada con hielo, para eliminar los componentes del medio. La biomasa de levadura se trató con el reactivo de extracción de proteína de levadura (Y-PER) según las instrucciones del fabricante (Pierce), para extraer enzimas intracelulares como arilsulfatasa. Estará claro para los expertos en la técnica que se pueden usar otros protocolos de lisis de levaduras para extraer la actividad de arilsulfatasa, como cizallamiento mecánico con perlas de vidrio, o tratamiento enzimático para disolver la pared celular con, por ejemplo, Zymolyase (véase, por ejemplo, Glover y Hames, DNA cloning 2 - a practical approach, IRL Press 1995).

25 La arilsulfatasa se midió en el extracto usando el método descrito en el Ejemplo 2. A partir de este experimento, está claro que mientras que la cepa madre contenía una cantidad apreciable de actividad de arilsulfatasa, no se pudo detectar tal actividad en la cepa 2359 Δ ARY. Cuando la actividad de β -galactosidasa (lactasa) se midió en este extracto según el Ejemplo 2, no se pudo detectar ninguna diferencia en la actividad de lactasa entre la cepa de tipo salvaje CBS 2359 y la cepa mutante 2359 Δ ARY, mostrando que la cepa mutante está específicamente perturbada en la actividad de arilsulfatasa.

30 La cepa mutante se puede usar para obtener una preparación de lactasa a escala industrial, principalmente desprovista de actividad de arilsulfatasa.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un producto lácteo que comprende usar una preparación de una lactasa neutra de *Kluyveromyces* que comprende menos de 30 unidades de actividad de arilsulfatasa por unidad de lactasa neutra (NLU) de actividad de lactasa.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha lactasa comprende menos de 20 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa, más preferiblemente menos de 10 unidades de actividad de arilsulfatasa por NLU de actividad de lactasa.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha lactasa es una lactasa producida intracelularmente.
4. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha lactasa es una lactasa de *K. lactis*.
- 10 5. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha lactasa tiene un óptimo de pH entre pH = 6 y pH = 8.
6. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que dicha lactasa tiene menos de 0,5 unidades de fluorescencia relativa (RFU)/min. de actividad de proteasa por NLU de actividad de lactasa.
7. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho producto lácteo es leche.
- 15 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha leche es leche de vaca.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha leche es leche UHT.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha lactasa se obtiene purificando una preparación de enzima bruta que contiene lactasa y arilsulfatasa, en el que la arilsulfatasa se separa de la enzima de interés.
- 20 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha purificación da como resultado una reducción de la actividad de arilsulfatasa de al menos 50%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99%.
12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, en el que dicha purificación es mediante cromatografía, preferiblemente en una única etapa de separación cromatográfica.
- 25 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha lactasa se obtiene mediante un método que comprende:
 - (a) cultivar una célula de *Kluyveromyces* deficiente en arilsulfatasa en un medio nutriente, en condiciones que conduzcan a la expresión de lactasa
 - (b) expresar la lactasa en dicha célula de *Kluyveromyces*, y
 - 30 (c) recuperar opcionalmente la lactasa del medio nutriente o de la célula de *Kluyveromyces*.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha lactasa se obtiene mediante un método que comprende:
 - (a) transformar una célula de *Kluyveromyces* deficiente en arilsulfatasa con un vector de expresión, en el que el vector expresa la lactasa,
 - 35 (b) cultivar la célula de *Kluyveromyces* en un medio nutriente, en condiciones que conduzcan a la expresión de la lactasa
 - (c) expresar la lactasa en la célula de *Kluyveromyces*, y
 - (d) recuperar opcionalmente la lactasa del medio nutriente o de la célula de *Kluyveromyces*.
- 40 15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha lactasa se obtiene mediante un método que comprende:
 - (a) cultivar una célula de *Kluyveromyces* en un medio nutriente que prohíbe la producción de arilsulfatasa y en condiciones que conduzcan a la expresión de la lactasa
 - (b) expresar la lactasa en dicha célula de *Kluyveromyces*, y
 - (c) recuperar opcionalmente la lactasa del medio nutriente o de la célula de *Kluyveromyces*.
- 45 16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha lactasa se obtiene mediante

un método que comprende:

- 5
- (a) transformar una célula de *Kluyveromyces* con un vector de expresión, en el que el vector expresa la lactasa,
 - (b) cultivar la célula de *Kluyveromyces* en un medio nutriente que prohíbe la producción de arilsulfatasa y en condiciones que conduzcan a la expresión de la lactasa
 - (c) expresar la lactasa en la célula de *Kluyveromyces*, y
 - (d) recuperar opcionalmente la lactasa del medio nutriente o de la célula de *Kluyveromyces*.
- 10
17. Uso de una preparación de una lactasa neutra procedente de *Kluyveromyces* que comprende menos de 30 unidades de actividad de arilsulfatasa por unidad de lactasa neutra (NLU) de actividad de lactasa, para producir un producto lácteo.
18. Uso según la reivindicación 17, en el que dicho producto lácteo es leche.
19. Uso según la reivindicación 18, en el que dicha leche es leche de vaca.
20. Uso según la reivindicación 18 ó 19, en el que dicha leche es leche UHT.

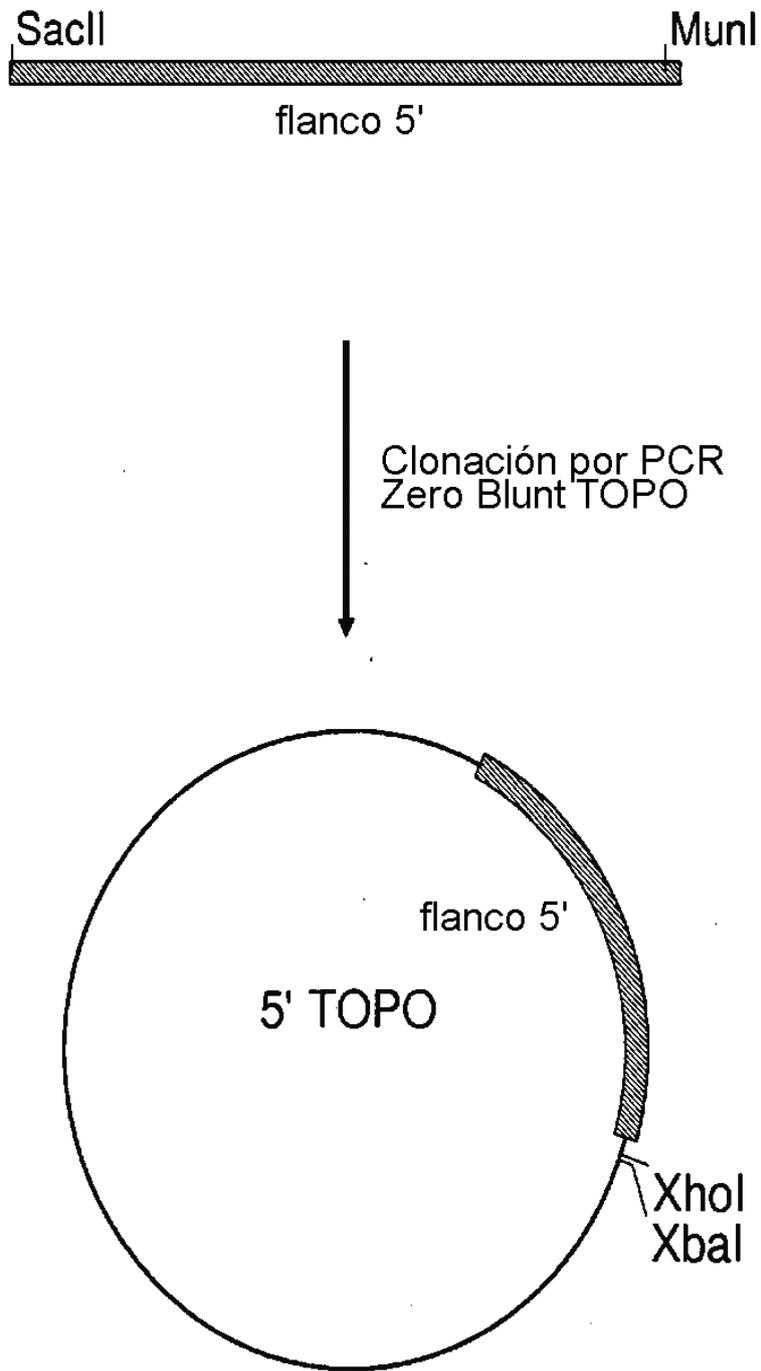


Figura 1

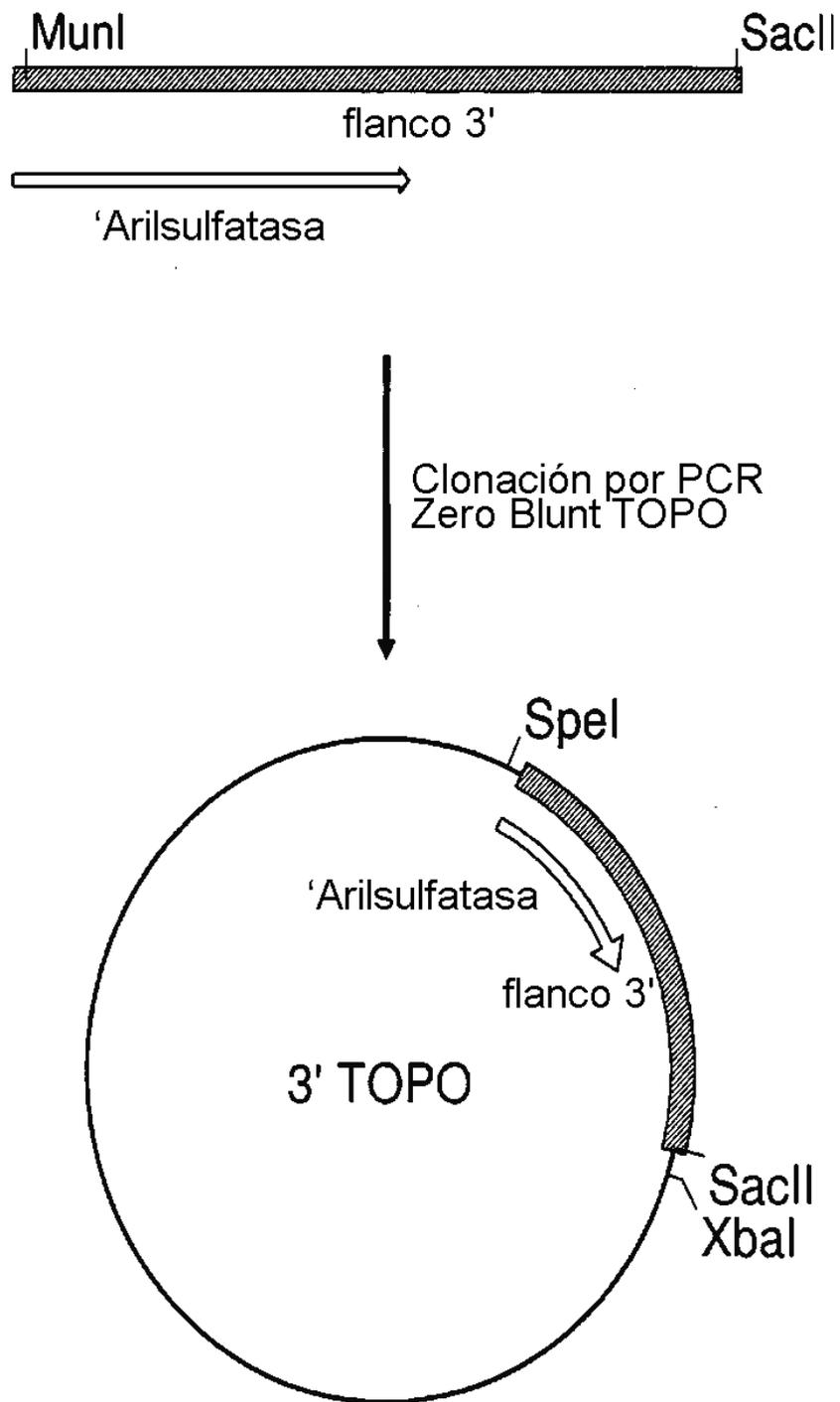


Figura 2

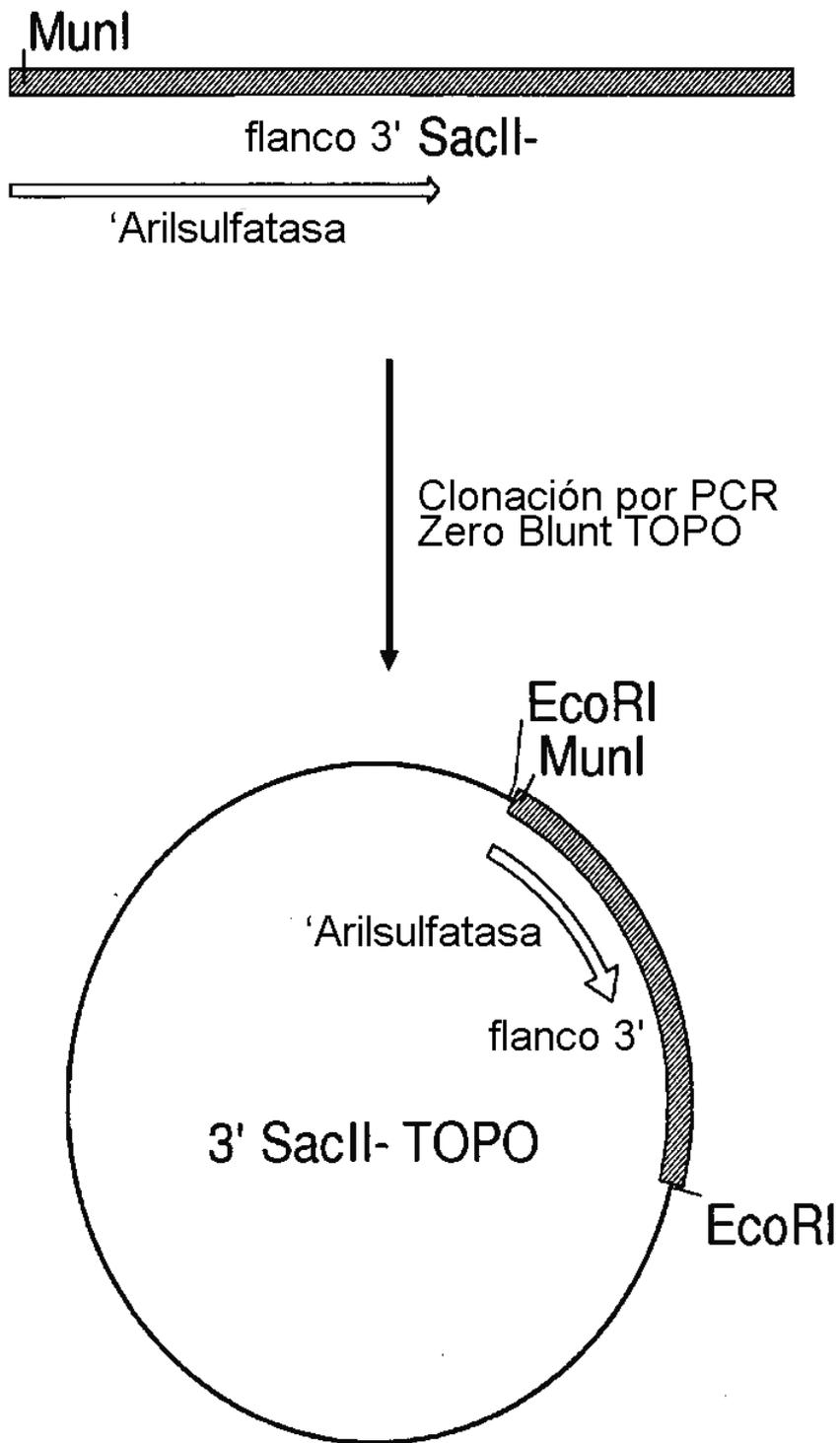


Figura 3

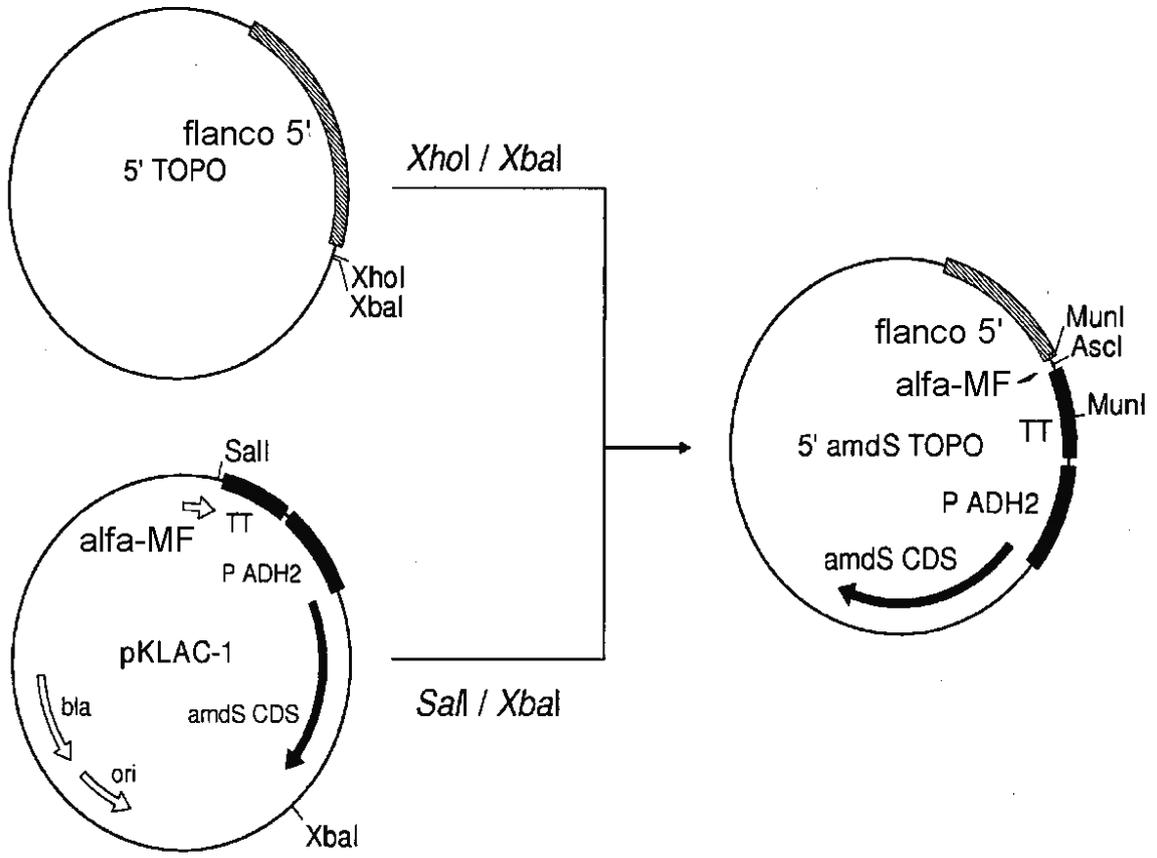


Figura 4

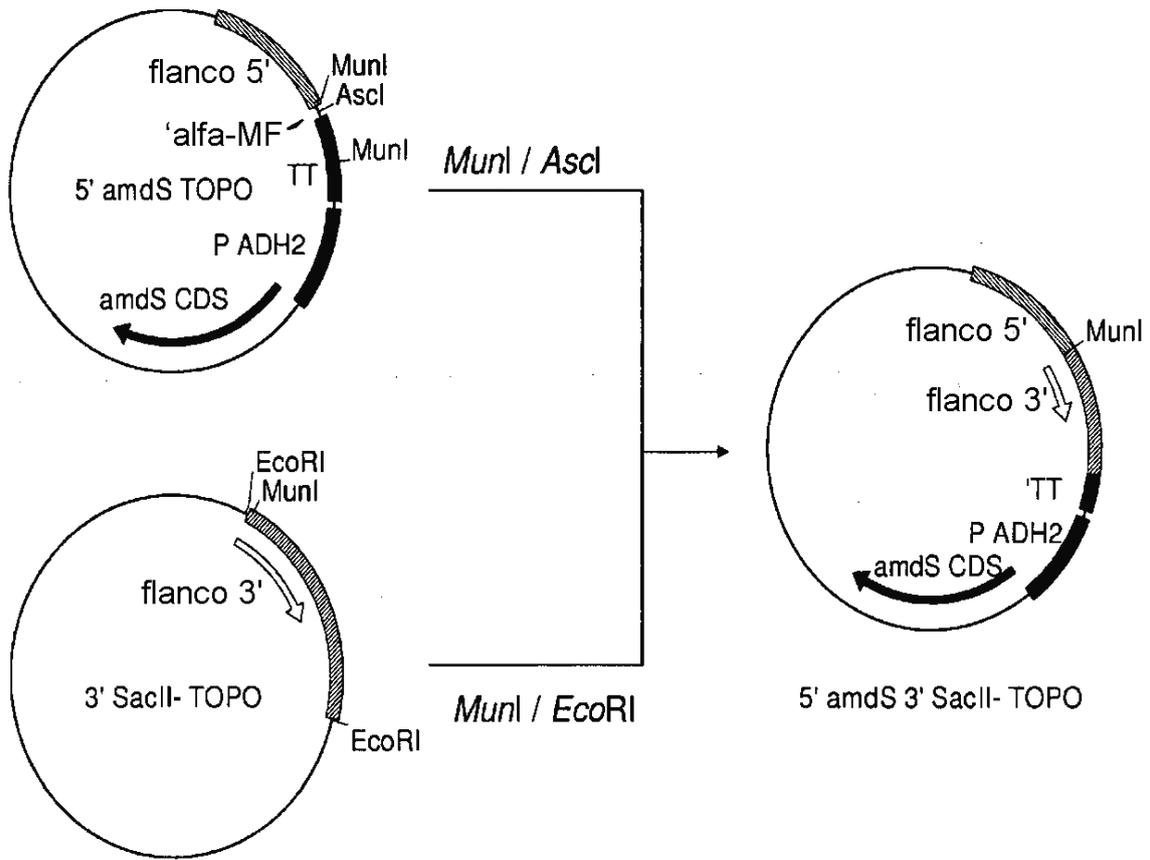


Figura 5

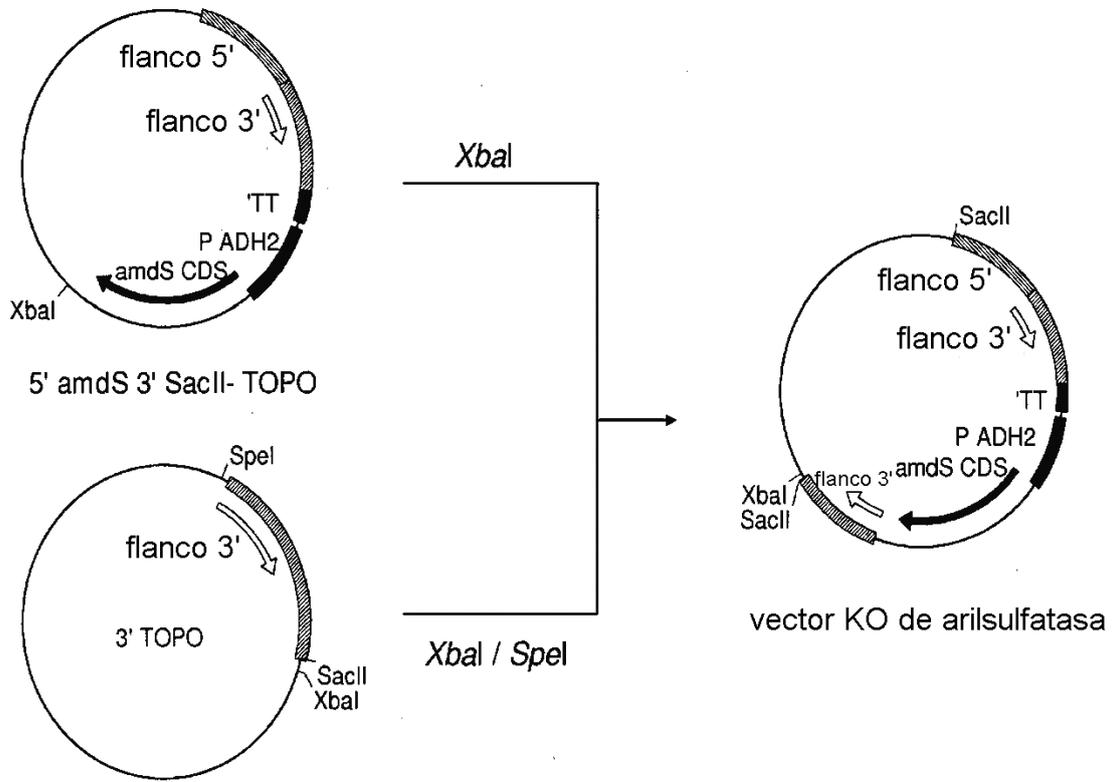


Figura 6

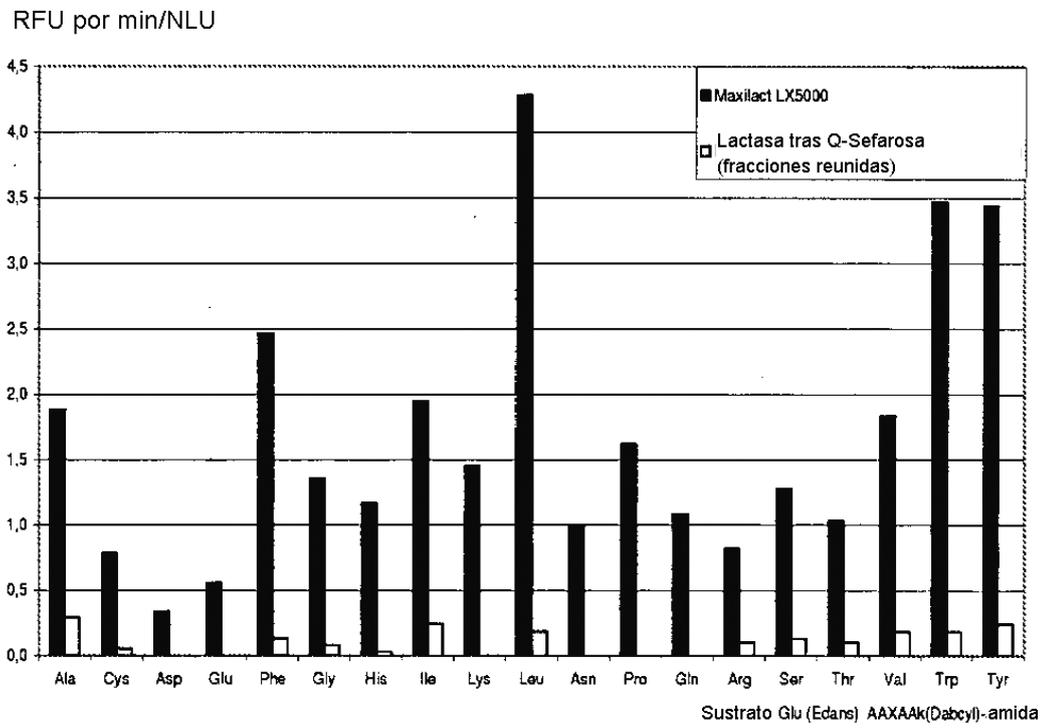


Figura 7