

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 506**

51 Int. Cl.:

A23L 2/60 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 19/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2007 E 07859342 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2211643**

54 Título: **L-arabinosa-isomerasa para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en un producto lácteo que contiene D-galactosa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2015

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)
145, rue de l'Université
75007 Paris, FR y
CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RHIMI, MOEZ;
CHOUAYEKH, HICHEM;
MAGUIN, EMMANUELLE y
BEJAR, SAMIR**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 542 506 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

L-arabinosa-isomerasa para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en un producto lácteo que contiene D-galactosa

5

[0001] La presente invención se refiere al uso de una L-arabinosa-isomerasa para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en un producto lácteo que contiene D-galactosa, en que dicho producto lácteo que contiene D-galactosa se selecciona del grupo que consta de leche, leche enriquecida con D-galactosa, leche que experimenta fermentación láctica, una leche fermentada y leche en la que la lactosa se ha procesado enzimáticamente, a un procedimiento para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa durante la fermentación láctica de la leche, a un procedimiento para la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado y a un aditivo edulcorante para un producto lácteo que comprende una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa aceptable para el consumo alimentario. La invención también se refiere a un microorganismo aceptable para el consumo alimentario que expresa una L-arabinosa-isomerasa exógena y a una L-arabinosa-isomerasa US100 de *Bacillus stearothermophilus* mutada, en particular a un mutante con una mayor tolerancia a la acidez y estabilidad a pH ácido o a un mutante con una temperatura óptima inferior.

[0002] Las bacterias lácticas (BL) constituyen un grupo comercialmente importante de microorganismos utilizado ampliamente en la industria alimentaria. Entre estas, los iniciadores lácteos *Lactobacillus delbrueckii*, subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus* se usan universalmente de manera conjunta en la fermentación de la leche a yogur (Tamine y Robinson, 1999, *Yoghurt Science and Technology*, 2.^a edición, Cambridge: Woodhead). Durante su crecimiento, como principal fuente de energía, se usa la lactosa, que es el único azúcar que se encuentra en la leche.

[0003] En las BL se conocen dos sistemas para el transporte y metabolismo de la lactosa: (i) un sistema de lactosa-fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) con un sistema de fosfo-β-galactosidasa (Postma y col., 1993, *Microbiol Rev.*, 57: 543-94) y (ii) un sistema de lactosa-permeasa de antiporte (LacS) con una β-galactosidasa (LacZ). El sistema PTS-PEP se encuentra en muchas especies incluidos los lactococos (Reizer y col., 1988, *Crit. Rev. Microbiol.*, 15: 297-338; Thompson, 1987, *FEMS Microb. Lett.*, 46: 221-23). Tanto *L. bulgaricus* como *S. thermophilus* utilizan la lactosa mediante la segunda ruta, en la que la lactosa se introduce en la célula como azúcar libre y es escindido por la β-galactosidasa en glucosa y galactosa (Foucaud y Poolman, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 22087-94; Leong-Morgenthaler y col., 1991, *J. Bacteriol.*, 173: 1951-7). La fracción de la glucosa de los monosacáridos generados se metaboliza posteriormente a piruvato, el cual se usa para producir lactato, mientras que la fracción de la galactosa es excretada por la mayor parte de las cepas de estas especies al medio en cantidades equimolares con la absorción de la lactosa, a pesar de que estos iniciadores contienen los genes de la ruta de Leloir, que es la ruta más extendida para el catabolismo de la galactosa en estas bacterias (de Vin y col., 2005, *Appl Environ. Microbiol.*, 71: 3659-67; Hickey y col., 1986, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 825-831; Hutkins y Ponne, 1991, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 941-944). Actualmente, el fenotipo negativo para galactosa se atribuye principalmente a un defecto en el mecanismo de inducción de las enzimas de la ruta de Leloir durante el crecimiento en lactosa y al modo de acción preferido de antiporte de la permeasa LacS *in vivo* (de Vin y col., 2005, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 3659-67; Turner y Martley, 1983, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 1932-1934).

[0004] Recientemente, se ha propuesto también leche con menor concentración de lactosa para las personas con intolerancia a la lactosa. La hidrólisis de la lactosa puede conseguir esta disminución de la concentración de lactosa con la producción de glucosa y galactosa. Los inventores han demostrado que la L-arabinosa-isomerasa (L-AI) puede usarse para convertir la galactosa que resulta de la hidrólisis de la lactosa en la edulcorante e hipocalórica D-tagatosa.

[0005] En la fabricación de yogur, especialmente en el caso de los productos con frutas/sabores, se añaden normalmente compuestos edulcorantes de gran valor calórico como la sacarosa para atenuar la acidez del producto. Dado que en la actualidad estamos asistiendo a un aumento de la demanda productos alimenticios hipocalóricos por parte del consumidor, especialmente en el caso de diabetes o de personas con dietas hipocalóricas, el verdadero reto es tratar de convertir la D-galactosa no consumida durante la producción del yogur en un edulcorante hipocalórico como la D-tagatosa, lo que podría minimizar la habitual adición de azúcares hipercalóricos. Este isómero natural de la D-galactosa es una cetohexosa rara con un poder edulcorante equivalente a la sacarosa, pero un valor calórico muy inferior, ya que es difícil de degradar por el cuerpo humano, lo que la hace un agente antihiper glucémico interesante.

[0006] No existe ninguna fuente biológica disponible para una extracción rentable de tagatosa. Se han

descrito dos procesos para la producción biológica de este edulcorante. El primero se basa en la capacidad de muchos microorganismos, como *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Klebsiella* y *Gluconobacter*, para convertir D-galactitol en D-tagatosa (Muniruzzaman y col., J. Ferment. Bioeng., 78 (1994) 145-148.; Shimonishi y col., J. Ferment. Bioeng., 79 (1995) 620-622.; Manzoni y col., Pro. Biochem., 36 (2001) 917-977; Rollini y Manzoni, Proc. Biochem., 40 (2005) 437-444). Sin embargo, no tiene uso industrial porque el D-galactitol es un sustrato costoso con bajo potencial de aplicación industrial. El segundo es una isomerización enzimática *in vitro* de la D-galactosa, con el uso de la actividad de una L-arabinosa-isomerasa (L-AI) (Haltrich y col., 1998, Ann. N. Y. Acad. Sci., 864: 295-9; Izumori y col., 1978, J. Bacteriol., 133: 413-4; Jorgensen y col., 2004, Appl. Microbiol. Biotechnol., 64: 816-22; Manzoni y col., 2001, Process Biochemistry, 36: 971-977). La enzima está implicada *in vivo* en la isomerización de L-arabinosa a L-ribulosa.

[0007] La L-arabinosa-isomerasa derivada de *B. stearothermophilus* US100 (L-AI US100) ha sido caracterizada (solicitud de patente internacional WO 2006/071203; Rhimi y Bejar, 2006, Biochim. Biophys. Acta, 1760: 191-9). La L-AI US100 tiene una actividad óptima a pH 7,5 y a 80 °C y, al contrario que la L-AI caracterizada anteriormente, tiene pocos requerimientos de iones metálicos.

[0008] Los inventores han demostrado que la L-AI US100 producida por bacterias lácticas es activa *in vivo*, ya que confiere una bioconversión eficaz de D-galactosa en D-tagatosa que es secretada por las células microbianas al medio de cultivo. Además, también se ha encontrado que la enzima L-AI US100 purificada convierte eficazmente D-galactosa en D-tagatosa en la leche, el medio industrial usado para la producción de yogur y también varios productos probióticos. Estos resultados prevén la explotación de la actividad de la L-AI para la producción de nuevos productos lácteos hipocalóricos que contengan D-tagatosa producida por isomerización enzimática.

[0009] La isomerización de la D-galactosa por L-arabinosa-isomerasas a alta temperatura aumenta la velocidad de reacción y permite desplazar el equilibrio entre D-galactosa y D-tagatosa hacia esta última. Por esta razón, se han aislado y caracterizado numerosas L-AI termoestables, incluidas las de los géneros *Thermus*, *Thermotoga* y *Geobacillus*. Sin embargo, la mayoría de estas enzimas tiene un pH óptimo alto, lo que es una importante desventaja con respecto a su aplicación durante la fermentación láctica, en la que el pH de la leche estará lejos del pH óptimo de la enzima.

[0010] La obtención de una nueva L-arabinosa-isomerasa tolerante a la acidez por ingeniería de proteínas se ha explorado previamente con el fin de encontrar L-AI activas a pH ácido. De hecho, Kim y col., 2006, describieron que las sustituciones V408R y N475Q permiten desplazar el pH óptimo de la L-AI T6 de *Geobacillus stearothermophilus* desde 8,5 a 7,5 (J. Appl. Microbiol., 101 (2006) 213). Además, Lee y col. describieron por primera vez la caracterización de una nueva L-AI tolerante a la acidez del acidófilo *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Appl. Environ. Microbiol., 71 (2005) 7888). Sin embargo, mientras que esta L-AI mutante es tolerante a la acidez, requiere cationes divalentes tanto para su actividad como para su estabilidad térmica (Co^{2+} 1 mM, Mn^{2+} 1 mM y Mg^{2+} 1 mM) y tiene una temperatura óptima relativamente baja, evaluada en 65 °C. Además, se ha propuesto una explicación no estructural para aclarar el efecto de estas sustituciones en el comportamiento de tolerancia a la acidez de la enzima.

[0011] Se han buscado nuevas L-AI que actúen a temperaturas mayores o menores y a bajo pH y que tengan muy pocos requerimientos de iones metálicos para su actividad y estabilidad térmica. Se han construido, purificado y caracterizado, en particular con respecto a la producción de D-tagatosa, un nuevo mutante Q268K de L-AI US100 tolerante a la acidez, un mutante N175H de L-AI US100 mesófilo y un mutante doble Q268K N175H de L-AI US100 tolerante a la acidez y mesófilo.

[0012] La invención se define mediante las reivindicaciones.

50 *L-arabinosa-isomerasas*

[0013] Las L-arabinosa-isomerasas (EC 5.3.1.4) son enzimas intracelulares que catalizan la conversión de L-arabinosa en L-ribulosa en sistemas biológicos. También se denominan D-galactosa-isomerasas, debido a su capacidad de isomerizar *in vitro* D-galactosa a D-tagatosa (Cheetam y Woottom, Enzyme and Microbial Technology, 15 (1993) 105).

[0014] En el contexto de la invención, el término "L-arabinosa-isomerasa" o "L-AI" denota generalmente cualquier enzima que catalice la conversión de L-arabinosa en L-ribulosa y preferentemente también isomericé D-galactosa a D-tagatosa. Una L-arabinosa-isomerasa puede ser una L-AI nativa (o natural) o un mutante de una L-AI

nativa, manipulada genéticamente para alterar una o más características fenotípicas de la L-AI nativa, en particular el óptimo de temperatura, el óptimo de pH, el requerimiento de iones, la afinidad por el sustrato, la estabilidad térmica y/o la tolerancia al pH, siempre que dicho mutante mantenga la capacidad de isomerizar D-galactosa a D-tagatosa y opcionalmente de convertir L-arabinosa en L-ribulosa.

5

[0015] La capacidad de una enzima para generar L-ribulosa o D-tagatosa puede ser determinada fácilmente por el experto en la técnica con el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico, descrito por Dische y Borenfreund (J. Biol. Chem., 192 (1951) 583), con la absorbancia medida a 560 nm. La producción de L-ribulosa o D-tagatosa puede detectarse también por cromatografía iónica de alto rendimiento (HPLC).

10

[0016] Las L-arabinosa-isomerasas se expresan en un gran número de organismos, incluidas plantas como el arroz japonés y microorganismos como levaduras o bacterias.

[0017] En particular, se han descrito y aislado numerosas L-arabinosa-isomerasas (L-AI) bacterianas y algunas se han depositado en bases de datos de secuencias. Por ejemplo, las L-arabinosa-isomerasas (L-AI) pueden derivar de:

- una bacteria del género *Thermus* (*Thermoanaerobacter mathranii*) o del género *Thermotoga* (*Thermotoga marítima* (entrada Q9WYB3 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Thermotoga neapolitana*),

20

- una bacteria del género *Geobacillus* (*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus kaustophilus*, entrada Q5KYP7 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot),

- *Alicyclobacillus acidocaldarius*,

25

- una bacteria del género *Bacillus* (*Bacillus stearothermophilus* (entrada Q9S467 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Bacillus licheniformis* (entradas Q65GC0 y Q65J10 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Bacillus clausii* (entrada Q5WL05 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Bacillus halodurans* (entrada Q9KBQ2 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Bacillus subtilis* (entrada P94523 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot)),

30

- *Clostridium acetobutylicum*,

- *E. coli* (entradas P58538, P08202, Q0TLS8, Q1RGD7 y Q8FL89 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot),

35 - *Mycobacterium smegmatis* (entrada Q9RHG2 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot),

- una bacteria del género *Salmonella* (*Salmonella* Paratyphi A, (entrada Q5PDF2 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Salmonella* Typhi (entrada P58539 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Salmonella* Choleraesuis (entrada Q57TF9 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Salmonella* Typhimurium (entrada P06189 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot)),

40

Shigella boydii (entrada Q326H3 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot),

- una bacteria del género *Shigella* (*Shigella sonnei* (entrada Q326H3 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Shigella dysenteriae* (entrada Q32K31 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Shigella flexneri* (entrada Q7UDT4 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot)),

45

- una bacteria del género *Yersinia* (*Yersinia pestis* (entradas P58540, Q1CIX9 y Q1C7J3 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot), *Yersinia pseudotuberculosis* (entrada Q66AF8 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot)),

- una bacteria de las Acidobacterias (entrada Q1IUW9 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot),

50

- *Klebsiella pneumoniae* (entrada Q48433 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot),

- *Oceanobacillus ihyensensis* (entrada Q8EMP4 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot),

55 - *Erwinia carotovora* (entrada Q6D4W5 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot) o

- *Mannheimia succiniciproducens* (entrada Q65WJ5 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot).

[0018] Una L-arabinosa-isomerasa (L-AI) de acuerdo con la invención puede derivar de cualquier organismo o

microorganismo, en particular de cualquiera de las bacterias anteriores y, más generalmente, de cualquier microorganismo comensal de humanos o animales. Por ejemplo, dicha L-AI puede derivar de una bacteria termófila, en particular una bacteria del género *Thermus* (*Thermoanaerobacter mathranii*), del género *Thermotoga* (*Thermotoga marítima*, *Thermotoga neapolitana*), del género *Geobacillus*, (*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*), de *Alicyclobacillus acidocaldarius* y del género *Bacillus* (*Bacillus stearothermophilus*). Dicha L-AI puede derivar también de una bacteria láctica, es decir, una bacteria que pertenece a los géneros *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Microbacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

10

[0019] Según se usa en este documento, con una L-arabinosa-isomerasa que “deriva”, por ejemplo, de una bacteria, se indica una L-AI aislada de una bacteria (L-AI nativa o natural) o mutantes de la misma que mantienen la capacidad de convertir D-galactosa en D-tagatosa y opcionalmente de isomerizar L-arabinosa a L-ribulosa.

15 **[0020]**

La capacidad de convertir D-galactosa en D-tagatosa y opcionalmente de isomerizar L-arabinosa a L-ribulosa puede detectarse según se describe en los ejemplos siguientes. Brevemente, un ensayo de conversión o isomerización puede realizarse a la temperatura óptima para la enzima, por ejemplo, 80 °C, durante 1 min para L-arabinosa o 10 min para D-galactosa, en una mezcla de reacción que contenga CoCl₂ 0,2 mM, MnSO₄ 1 mM, 50 µl de extracto enzimático crudo en una dilución adecuada, L-arabinosa (o D-galactosa) 5 mM y tampón MOPS 100 mM (pH 7,5) hasta completar un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción se incubaba. Después, la actividad de conversión/isomerasa puede medirse mediante la determinación de la cantidad de L-ribulosa o D-tagatosa producida por el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico (Dische y Borenfreund, 1951, J. Biol. Chem., 192: 583-7) y medición de la absorbancia a 560 nm. Sin embargo, puede usarse cualquier otro procedimiento adecuado conocido por el experto en la técnica, como la cromatografía.

25

[0021] La L-arabinosa-isomerasa puede derivar de *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Más específicamente, dicha L-arabinosa-isomerasa puede ser la L-AI de *Alicyclobacillus acidocaldarius* clonada por Lee y col., (2005, Appl. Environ. Microbiol., 71(12): 7888-7896; “AAAI”, número de acceso de GenPept AAY68209) o su mutante K269E (AAAI-K269E).

30

[0022] La L-arabinosa-isomerasa puede derivar también de *Bacillus halodurans*. Más específicamente, dicha L-arabinosa-isomerasa puede ser la L-AI de *Bacillus halodurans* descrita en Lee y col. (2005, Appl. Environ. Microbiol., 71(12): 7888-7896; “BHAI”, entrada Q9KBQ2 en el banco UniProtKB/Swiss-Prot) o su mutante E268K (BHAI-E268K).

35

[0023] La L-arabinosa-isomerasa puede derivar también de la cepa US100 de *Bacillus stearothermophilus*. Dicha L-arabinosa-isomerasa puede ser L-AI US100, según describen Rhimi y Bejar (Biochim. Biophys. Acta, febrero de 2006; 1760(2): 191-9; solicitud de patente internacional WO 2006/071203). La secuencia polinucleotídica de la L-AI US100 se muestra en SEQ ID NO:1 (número de acceso de GenBank AJ866972) y su secuencia aminoacídica se muestra en SEQ ID NO:2.

40

[0024] Dicha L-arabinosa-isomerasa puede ser también un mutante Q268K de L-AI US100, es decir, una L-AI US100 mutada que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2. De hecho, según se describe en este documento, se ha obtenido por manipulación genética un mutante Q268K de L-AI US100. La caracterización bioquímica y cinética demostró que este mutante es más tolerante a la acidez y más estable a pH ácido que la L-AI US100 natural y que este mutante no requiere la adición de iones metálicos para llevar a cabo la producción de D-tagatosa.

45

[0025] Además, se ha desarrollado un mutante N175H de L-AI US100, para el que se demostró una mesofilia mejorada en comparación con la L-AI US100 natural. Además se encontró que el mutante doble Q268K N175H de L-AI US100 presentaba tanto una mejor tolerancia a la acidez como una mejor mesofilia.

50

[0026] Por lo tanto, la invención se refiere también a una L-AI US100 mutada que comprende (i) una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2, (ii) una sustitución de N por H en la posición 175 de SEQ ID NO:2 o (iii) una sustitución de N por H en la posición 175 de SEQ ID NO:2 y una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2 y sus secuencias codificantes.

55

[0027] Por consiguiente, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende o consta de la secuencia aminoacídica mostrada en SEQ ID NO:2, en la que (i) Q268 se sustituye por K (Q268K), (ii) N175 se

sustituye por H (N175H) o (iii) Q268 se sustituye por K y N175 se sustituye por H (Q268K N175H).

- [0028]** La invención también se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende o consta de una secuencia que codifica la secuencia aminoacídica mostrada en SEQ ID NO:2 en la que (i) Q268 se sustituye por K, (ii) N 175 se sustituye por H o (iii) Q268 se sustituye por K y N175 se sustituye por H. En particular, dicho ácido nucleico aislado puede comprender o consta de la secuencia SEQ ID NO:1, en la que (i) C en la posición 802 se sustituye por A (802C>A), (ii) A en la posición 523 se sustituye por C (523A>C) o (iii) C en la posición 802 se sustituye por A y A en la posición 523 se sustituye por C (802C>A, 523A>C).
- 10 **[0029]** Siguiendo la nomenclatura de Dunnen y Antonarakis (Hum. Mutation, 2000, 15: 7-12), las sustituciones de aminoácidos se designan, por ejemplo, mediante "Q268K", que significa que la Gln en la posición 268 se sustituye por Lys. En cuanto al ácido nucleico, las sustituciones se designa mediante ">", por ejemplo, "802C>A" indica que en el nucleótido 802 de la secuencia de referencia, se cambia una C por una A.
- 15 *Microorganismos que expresan una L-arabinosa-isomerasa*
- [0030]** La solicitud desvela también un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa (L-AI). Preferentemente, el microorganismo es una bacteria o una levadura.
- 20 **[0031]** Preferentemente, dicho microorganismo es aceptable para el consumo alimentario. Según se usa en este documento, en particular una bacteria o levadura "aceptable para el consumo alimentario" denota un microorganismo que puede añadirse a la leche destinada a la fabricación de productos lácteos (en particular, productos lácteos fermentados) para el consumo humano.
- 25 **[0032]** La invención se refiere a una bacteria aceptable para el consumo alimentario que expresa una L-arabinosa-isomerasa exógena.
- [0033]** Una bacteria aceptable para el consumo alimentario puede ser una bacteria láctica (BL).
- 30 **[0034]** Según se usa en este documento, las "bacterias lácticas" denotan bacterias grampositivas productoras de ácido láctico que pertenecen a los géneros *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Microbacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. En el contexto de la invención, la BL será preferentemente una bacteria reconocida generalmente como
35 segura (GRAS).
- [0035]** Desde el punto de vista industrial, las bacterias lácticas más útiles son especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus*. Preferentemente, dicha bacteria láctica se selecciona del grupo que consta de *Bifidobacterium bifidus*, *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus fermentum* y *Streptococcus thermophilus*. Algunas bacterias lácticas se consideran "probióticas" (es decir, proporcionan beneficios para la salud): por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus gasserii*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*.
45
- [0036]** El microorganismo, en particular, el microorganismo aceptable para el consumo alimentario puede ser también una bacteria no láctica, por ejemplo, una bacteria probiótica no láctica o, más generalmente, un microorganismo probiótico como una levadura.
- 50 **[0037]** El microorganismo que expresa la L-AI, especialmente la bacteria que expresa la L-AI puede expresar la L-AI naturalmente (es decir, intrínsecamente). En un caso tal, se dice que dicha L-AI es endógena al microorganismo. Por ejemplo, este es el caso de *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum*.
- [0038]** La L-arabinosa-isomerasa puede ser también exógena, es decir, extraña o extrínseca al microorganismo. Un microorganismo, como una bacteria o una levadura, que expresa una L-arabinosa-isomerasa exógena puede ser preparado fácilmente por un experto en la técnica mediante los procedimientos convencionales de ingeniería genética. En particular, la bacteria o levadura pueden transformarse con un vector adecuado para la transformación de una bacteria o levadura, según sea apropiado, en que el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa. Cuando el microorganismo es una bacteria, puede usarse

cualquier otro procedimiento para la introducción de una secuencia codificante de una L-arabinosa-isomerasa en la bacteria, por ejemplo, conjugación bacteriana o transferencia mediante fagos.

[0039] Según se usa en este documento, el término “transformación” significa generalmente la introducción de un gen exógeno o una secuencia de ADN o ARN en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora exprese el gen o secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducidos. Según se usa en este documento, una célula hospedadora que ha sido “transformada” con una secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa denota una célula que recibe y expresa un ADN o ARN que codifica una L-AI, cualquiera que sea el procedimiento usado para la introducción de dicho ADN o ARN (por ejemplo, transformación con un vector, conjugación bacteriana, transferencia por medio de fagos, transposición, recombinación homóloga).

[0040] Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” indican el vehículo mediante el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen exógeno) en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión de la secuencia introducida. Un tipo común de vector es un “plásmido” que, generalmente, es una molécula autónoma de ADN bicatenario, normalmente de origen bacteriano, que puede aceptar fácilmente ADN adicional (exógeno) y que puede introducirse fácilmente en una célula hospedadora adecuada. Un vector plasmídico contiene a menudo ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para la inserción de ADN exógeno. Se ha descrito un gran número de vectores para la replicación y/o expresión en diversos hospedadores procariontes. Algunos ejemplos no limitantes incluyen los plásmidos pKK (Clontech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, WI, EE. UU.), plásmidos pRSET p pREP (Invitrogen, San Diego, CA, EE. UU.) o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA, EE. UU.).

[0041] Por consiguiente, la solicitud desvela además un vector adecuado para la transformación de un microorganismo, en particular, una bacteria o levadura aceptable para el consumo alimentario, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa.

[0042] En dicho vector, la secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa puede ponerse bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo, por ejemplo, el promotor del gen *hlyA* de *L. bulgaricus* ATCC 11842. También pueden usarse promotores inducibles.

[0043] La secuencia codificante de una L-arabinosa-isomerasa también puede fusionarse con una señal de secreción que dirija la secreción del polipéptido codificado.

[0044] La L-arabinosa-isomerasa codificada puede ser cualquier L-AI, según se describe anteriormente. En particular, la L-AI puede derivar de una bacteria seleccionada del grupo que consta de una bacteria del género *Thermus* (*Thermoanaerobacter mathranii*), del género *Thermotoga* (*Thermotoga marítima*, *Thermotoga neapolitana*), del género *Geobacillus*, (*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*), de *Alicyclobacillus acidocaldarius*, del género *Lactobacillus* (en particular *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*), del género *Bacillus* (*Bacillus stearothermophilus*) y de una bacteria láctica.

[0045] El vector de acuerdo con la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa seleccionada del grupo que consta de AAAI, AAAI-K269E, BHAI, BHAI-E268K, L-AI US100 y los mutantes de L-AI US100 L-AI US100-Q268K, L-AI US100-N175H y L-AI US100-(Q268K, N175H).

[0046] La invención también comprende la bacteria aceptable para el consumo alimentario, transformada con (es decir, que comprende) uno de los vectores según se describen anteriormente o que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa según se define anteriormente.

Conversión de D-galactosa en D-tagatosa en la leche

[0047] Conceptualmente, la conversión de D-galactosa en D-tagatosa por la L-arabinosa-isomerasa directamente en la leche, en particular durante la fermentación láctica, podría haber sido obstaculizada por varios parámetros:

- la leche es un medio graso complejo y no podía predecirse si los componentes de la leche podrían inactivar la L-arabinosa-isomerasa al añadir la enzima directamente a la leche;

- las bacterias lácticas, en particular *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* son bacterias negativas para galactosa que excretan galactosa a su medio de cultivo durante la fermentación láctica de la leche. Dado que las L-arabinosa-isomerasas son enzimas intracelulares, no se sabía si sería posible la bioconversión de la D-galactosa extracelular en D-tagatosa por una bacteria que expresara la L-AI, debido a una posible falta de accesibilidad de la enzima a su sustrato;

- durante la fermentación láctica, el pH de la leche varía desde 6,5-6,8 hasta aproximadamente 4,5 a 5,5. Dado que el pH óptimo de las L-AI y en particular de la enzima modelo usada por los inventores (L-AI de *Bacillus stearothermophilus* US100) está alejado del pH alcanzado durante la fermentación láctica, era cuestionable si la tasa de conversión de D-galactosa en D-tagatosa podría ser significativa.

[0048] Sin embargo, los inventores demostraron que la L-AI puede asegurar con éxito la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en la leche, especialmente durante la fermentación láctica de la leche.

15 **[0049]** Por consiguiente, la invención se refiere al uso de una L-arabinosa-isomerasa (L-AI) para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en un producto lácteo que contiene D-galactosa, en que dicho producto lácteo que contiene D-galactosa se selecciona del grupo que consta de leche, leche enriquecida con D-galactosa, leche que experimenta fermentación láctica, una leche fermentada y leche en la que la lactosa se ha procesado enzimáticamente.

20 **[0050]** Un producto lácteo denota generalmente un producto alimenticio producido a partir de la leche e incluye la leche (por ejemplo, leche opcionalmente parcial o totalmente desnatada y/o homogenizada y/o pasteurizada). Un producto lácteo que contiene D-galactosa puede incluir leche suplementada con D-galactosa, leche que experimenta fermentación láctica, leche fermentada o leche en la que la lactosa se ha procesado a glucosa y galactosa (por ejemplo, leche tratada con una lactasa, como una β -galactosidasa, para hidrolizar enzimáticamente la lactosa).

25 **[0051]** En particular, la invención puede referirse al uso de una L-arabinosa-isomerasa (L-AI) para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa durante la fermentación láctica de la leche o en una leche fermentada.

30 **[0052]** La L-arabinosa-isomerasa puede ser cualquier L-arabinosa-isomerasa, según se describe anteriormente.

[0053] La conversión de la D-galactosa en D-tagatosa puede llevarse a cabo mediante la adición directa de una L-AI o un microorganismo que expresa una L-AI al producto lácteo que contiene D-galactosa.

35 **[0054]** La conversión también puede llevarse a cabo poniendo en contacto el producto lácteo que contiene D-galactosa con una L-AI o un microorganismo que expresa una L-AI. De acuerdo con esta realización, la L-AI o el microorganismo pueden recuperarse del producto final, por lo tanto, están ausentes del producto final. La puesta en contacto puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición al producto lácteo de una L-AI o un microorganismo que expresa una L-AI atrapados en una estructura sólida, por ejemplo, esferas de alginato, y mediante la retirada de la estructura sólida, preferentemente cuando la conversión de la D-galactosa es suficiente para obtener la propiedad deseada. La puesta en contacto puede realizarse también poniendo en contacto el producto lácteo con una L-AI o un microorganismo que expresa una L-AI inmovilizados en un soporte sólido como una columna o un reactor.

45 **[0055]** De acuerdo con una realización, se añade al menos una L-arabinosa-isomerasa al producto lácteo. Cuando el producto lácteo es leche que va a fermentarse, la adición de la L-arabinosa-isomerasa a la leche puede realizarse antes de iniciarse la fermentación láctica, durante o al final de la fermentación láctica.

50 **[0056]** El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de L-arabinosa-isomerasa que puede añadirse al producto lácteo, en particular a una leche destinada a fermentación láctica. Por ejemplo, la cantidad de L-AI añadida puede estar comprendida entre 0,1 y 20 mg/ml (mg de L-AI/ml de leche), preferentemente entre 0,5 y 10 mg/ml, con mayor preferencia entre 1 y 5 mg/ml y con aún mayor preferencia entre 2 y 3 mg/ml.

55 **[0057]** De acuerdo con otra realización, se añade al menos un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa al producto lácteo. Dicho microorganismo es preferentemente una bacteria, en particular una bacteria aceptable para el consumo alimentario. Cuando el producto lácteo es una leche que va a fermentarse, la adición del microorganismo que expresa la L-AI a la leche puede realizarse antes de iniciarse la fermentación láctica, durante o al final de la fermentación láctica.

[0058] Los microorganismos que expresan L-arabinosa-isomerasas se han definido anteriormente. Puede ser un microorganismo transformado para expresar la L-arabinosa-isomerasa. Alternativamente, el microorganismo que expresa la L-arabinosa-isomerasa puede expresar la L-arabinosa-isomerasa de manera natural.

5

[0059] La cantidad del microorganismo que puede añadirse al producto lácteo puede ser determinada fácilmente por el experto en la técnica. En particular, el nivel de actividad de la L-AI del microorganismo en el producto lácteo puede evaluarse mediante el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico, de acuerdo con Dische y Borenfreund (J. Biol. Chem., 192 (1951) 583) y, después, pueden determinarse las cantidades de bacterias que se requieren para proporcionar la actividad de la L-AI deseada en el producto lácteo.

10

[0060] La fermentación láctica de la leche puede destinarse a la producción de cualquier producto lácteo fermentado, por ejemplo, yogur (yogur agitado, yogur firme o bebidas de yogur), suero de mantequilla cultivado (leche desnatada o entera fermentada principalmente con *Lactobacillus lactis*), leche acidófila (es decir, una leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus*), crema agria (crema inoculada principalmente con *Lactococcus lactis*) y bebidas o productos locales como kéfir, kumis, bebidas basadas en cepas de lactobacilos o bifidobacterias, o labneh.

15

[0061] En particular, el yogur se produce mediante inoculación de la leche con un cultivo iniciador que generalmente es una mezcla simbiótica de *Streptococcus thermophilus* (ST) y *Lactobacillus bulgaricus* (LB).

20

Procedimiento de producción de productos lácteos que contienen D-tagatosa, un aditivo edulcorante para la leche

[0062] La solicitud desvela un procedimiento para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en un producto lácteo que contiene D-galactosa, en que el procedimiento comprende la etapa de la adición de al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa aceptable para el consumo alimentario a dicho producto lácteo que contiene D-galactosa, con lo que la D-galactosa presente en el producto lácteo se convierte en D-tagatosa.

25

[0063] La solicitud también desvela un procedimiento para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en un producto lácteo que contiene D-galactosa, en que el procedimiento comprende la etapa de la puesta en contacto de dicho producto lácteo que contiene D-galactosa con al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa, con lo que la D-galactosa presente en el producto lácteo se convierte en D-tagatosa.

30

35

[0064] De acuerdo con la invención, el producto lácteo que contiene D-galactosa es una leche fermentada o una leche que experimenta fermentación láctica y los procedimientos anteriores consisten entonces en procedimientos para la conversión de la D-galactosa producida por la fermentación láctica de la leche en D-tagatosa.

[0065] Dicho procedimiento para la conversión de la D-galactosa producida por la fermentación láctica de la leche en D-tagatosa puede comprender las etapas de:

40

a) adición a la leche de al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa aceptable para el consumo alimentario;

45

b) opcionalmente, inoculación de la leche con una o más bacterias lácticas; y

c) realización de la fermentación láctica de la leche;

50

con lo que la D-galactosa producida en la leche por la fermentación láctica se convierte en D-tagatosa.

[0066] La invención proporciona además un procedimiento para la conversión de la D-galactosa producida por la fermentación láctica de la leche en D-tagatosa, en que el procedimiento comprende las etapas de:

55

a) puesta en contacto de la leche con al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa;

b) opcionalmente, inoculación de la leche con una o más bacterias lácticas;

c) realización de la fermentación láctica de la leche; y

d) opcionalmente, recuperación de dichos al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa de la leche fermentada obtenida en la etapa c);

5

con lo que la D-galactosa producida en la leche durante la fermentación láctica se convierte en D-tagatosa.

[0067] La etapa a) de los procedimientos anteriores para la conversión de la D-galactosa producida por la fermentación láctica de la leche en D-tagatosa puede llevarse a cabo antes, simultáneamente o después de la etapa c).

10

[0068] Cuando el procedimiento implica la adición de un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa o la puesta en contacto con el mismo, si dicho microorganismo no es una bacteria láctica, el procedimiento comprende entonces una etapa de inoculación de la leche con al menos una bacteria láctica, de modo que pueda llevarse a cabo dicha fermentación láctica de la leche.

15

[0069] De hecho, la presencia de bacterias lácticas en la leche es obligatoria para poder realizar la fermentación láctica. Si el microorganismo que expresa la L-arabinosa-isomerasa es una bacteria láctica, la adición de una o más bacterias lácticas según se menciona en la etapa b) es opcional.

20

[0070] En el procedimiento en el que la L-AI o el microorganismo que expresa la L-AI se ponen en contacto con la leche que va a fermentarse o experimenta fermentación, la etapa d) se lleva a cabo preferentemente una vez que ha finalizado la fermentación láctica de la leche.

25

[0071] La puesta en contacto puede efectuarse según se describe anteriormente, por ejemplo, mediante la adición al producto lácteo de una L-AI o un microorganismo que expresa una L-AI atrapados en una estructura sólida, por ejemplo, esferas de alginato, y la retirada de la estructura sólida cuando la conversión de la D-galactosa esencialmente ha finalizado. La puesta en contacto puede efectuarse también poniendo en contacto el producto lácteo con una L-AI o un microorganismo que expresa una L-AI inmovilizados en un soporte sólido, como una columna o un reactor.

30

[0072] La leche que va a fermentarse puede ser, por ejemplo, leche cruda, leche homogeneizada y/o pasteurizada, leche desnatada, una leche enriquecida con D-galactosa o leche en la que la lactosa se ha procesado enzimáticamente a glucosa y galactosa. En el transcurso del procedimiento anterior para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa durante la fermentación láctica de la leche, se obtiene un producto lácteo fermentado que contiene D-tagatosa. Dado que la D-tagatosa es un edulcorante (endulzante), el procedimiento para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa también resulta en la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado.

35

[0073] Por lo tanto, la invención proporciona además un procedimiento para la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado que comprende las etapas de:

40

a) adición de al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa aceptable para el consumo alimentario a dicho producto lácteo fermentado; o

45

b) puesta en contacto de dicho producto lácteo que contiene D-galactosa con al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa;

con lo que se obtiene un producto lácteo fermentado edulcorado.

50

[0074] Por consiguiente, la invención proporciona además un procedimiento para la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado que comprende las etapas de:

a) adición a la leche de al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa aceptable en la fermentación de la leche;

55

b) opcionalmente, inoculación de la leche con una o más bacterias lácticas; y

c) realización de la fermentación láctica de la leche;

con lo que se obtiene un producto lácteo fermentado edulcorado.

[0075] Otro procedimiento para la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado puede comprender las etapas de:

5

a) puesta en contacto de la leche con al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa;

b) opcionalmente, inoculación de la leche con una o más bacterias lácticas;

10

c) realización de la fermentación láctica de la leche; y

d) opcionalmente, recuperación de dichos al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa de la leche fermentada obtenida en la etapa c);

15

con lo que se obtiene un producto lácteo fermentado edulcorado.

[0076] La etapa a) de los procedimientos anteriores para la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado puede llevarse a cabo antes, simultáneamente o después de la etapa c).

20

[0077] Cuando el procedimiento implica la adición de un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa o la puesta en contacto con el mismo, si dicho microorganismo no es una bacteria láctica, el procedimiento comprende entonces una etapa de inoculación de la leche con al menos una bacteria láctica, de modo que pueda llevarse a cabo dicha fermentación láctica de la leche.

25

[0078] En el procedimiento en el que la L-AI o el microorganismo que expresa la L-AI se ponen en contacto con la leche que va a fermentarse o experimenta fermentación, la etapa d) se lleva a cabo preferentemente una vez que ha finalizado la fermentación láctica de la leche.

30

[0079] En los procedimientos anteriores, dicho microorganismo es preferentemente una bacteria aceptable para el consumo alimentario.

[0080] Las bacterias lácticas (que expresan L-AI o no) para usar en los procedimientos para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa o para la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado pueden ser cualquiera de las bacterias lácticas que se han definido anteriormente. Además, la L-arabinosa-isomerasa y/o el microorganismo que expresa la L-arabinosa-isomerasa para añadir a la leche son según se describen anteriormente.

35

[0081] La etapa c) de la realización de la fermentación láctica de la leche se efectúa simplemente mediante el cultivo de las bacterias lácticas en las condiciones y durante el tiempo suficiente para que tenga lugar la fermentación láctica. Las condiciones (temperatura, etc.) y la duración del cultivo se elegirán en función del tipo de producto lácteo fermentado que se desea preparar. La D-galactosa es producida por las bacterias lácticas durante la fermentación láctica y convertida en D-tagatosa por la actividad de una L-AI.

40

[0082] Según se describe anteriormente, el producto lácteo fermentado que se produce puede seleccionarse del grupo que consta de yogur, suero de mantequilla cultivado, leche acidófila, crema agria, kéfir, kumis y labneh.

45

[0083] En último término, la L-arabinosa-isomerasa o el microorganismo que expresa la L-arabinosa-isomerasa (en particular, una bacteria y, preferentemente, una bacteria aceptable para el consumo alimentario) que se añade a la leche actúa como un aditivo edulcorante durante la fermentación láctica de la leche. Por consiguiente, la invención también se refiere a un aditivo edulcorante para la leche que comprende una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa según se definen en este documento. Dicho aditivo está especialmente destinado al uso en la fabricación de productos lácteos fermentados.

50

[0084] La invención se describirá en detalle a la vista de las figuras y ejemplos siguientes.

55

FIGURAS

[0085]

Figura 1: acidificación y producción de D-tagatosa durante el cultivo de MRS9 en el medio MRS enriquecido con galactosa. El cultivo se llevó a cabo a 37 °C. (A): perfil de pH, (♦): producción de D-tagatosa con la cepa MRS9.

Figura 2: acidificación y producción de D-tagatosa durante el cultivo de MRS12 en el medio M17 enriquecido con galactosa. El cultivo se llevó a cabo a 37 °C. (A): perfil de pH, (■): producción de D-tagatosa con la cepa MRS12.

Figura 3: producción de D-tagatosa durante el cultivo a pH 6,4 de MRS9 en MRS enriquecido con galactosa y de MRS12 en M17 enriquecido con galactosa. El cultivo tuvo lugar a 37 °C. (A): perfil de pH, (♦): producción de D-tagatosa con la cepa MRS9, (■): producción de D-tagatosa con la cepa MRS12.

10

Figura 4: cinética de la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en leche con D-galactosa (10 g/l) y la L-AI US100 purificada (3 mg/ml). La incubación se llevó a cabo a 42 °C.

Figura 5: perfil de actividad en función de la temperatura de la L-AI US100 purificada y sus derivados. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones estándar en presencia de L-arabinosa 5 mM. Las actividades a la temperatura óptima se definieron como el 100 %.

15

Figura 6: perfiles de actividad en función del pH de la L-AI US100 purificada y sus derivados. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones estándar en presencia de L-arabinosa 5 mM. Las actividades al pH óptimo se definieron como el 100 %.

20

Figura 7: producción de D-tagatosa con el uso de esferas que contienen células que expresan la L-AI US100 natural en leche enriquecida en D-galactosa por hidrólisis de la lactosa.

Figura 8: producción de D-tagatosa con el uso de esferas que contienen células que expresan la L-AI mutada N175H Q268K en leche enriquecida en D-galactosa por hidrólisis de la lactosa.

25

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1: bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa en leche con el uso de microorganismos que expresan una L-arabinosa-isomerasa

- Material y procedimientos

35 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

[0086] Las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* se cultivaron en condiciones anaerobias a 42 °C o 37 °C en el medio MRS (Difco) (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960, J. Appl. Bacteriol., 23: 130-135) y en el medio M17-lactosa, (Terzaghi y Sandine, 1975, Appl. Microbiol., 29: 807-813), respectivamente. Estos iniciadores también se cultivaron en leche desnatada (leche en polvo de baja temperatura Nilac, NIZO) calentada durante 10 min a 95 °C (Courtin, Monnet y Rul, 2002, Microbiology, 148: 3413-21). Se prepararon cultivos madre de cada cepa de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* después de su crecimiento a 37 °C en leche desnatada enriquecida con un antibiótico, en caso necesario. El crecimiento de los cultivos se detuvo a pH 5,5 y el número de bacterias se estimó por distribución en placa de diluciones apropiadas del cultivo en un medio con agar: para las células de *S. thermophilus* se usó M17-lactosa y para las células de *L. bulgaricus*, MRS-lactosa, pH 5,2. Al final del cultivo, las bacterias se congelaron directamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C.

40

45

[0087] Se prepararon cultivos mixtos de cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* naturales y recombinantes a 42 °C y 37 °C, respectivamente, mediante la inoculación de leche desnatada con 10⁹ ufc/ml de los cultivos madre de cada cepa. Periódicamente, se midió el pH de los cultivos y se determinó el número de bacterias según se describe anteriormente. En caso necesario, se usaron antibióticos a las concentraciones siguientes: para *E. coli*, ampicilina (100 µg/ml) o eritromicina (160 µg/ml); para *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, eritromicina (5 µg/ml). Para el cultivo líquido, las cepas de BL recombinantes se inocularon a partir de un cultivo incubado durante la noche a DO_{600 nm} = 0,1 y el cultivo se detuvo a DO_{600 nm} = 1.

50

55

Manipulaciones y secuenciación de ADN

[0088] Las técnicas clásicas de biología molecular y el aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* y *S. thermophilus* se efectuaron según se describe en Sambrook y col. (1989). El ADN plasmídico de *L. bulgaricus* se

preparó según se ha descrito previamente por Serror y col. (2002, Appl. Environ. Microbiol., 68: 46-52). Las enzimas de restricción y modificación de ADN se usaron de acuerdo con la recomendación de los proveedores. Los oligonucleótidos usados en este trabajo se adquirieron de PROLIGO (Japón) y MWG (Francia). En caso necesario, se aislaron fragmentos de ADN de geles de agarosa mediante el kit GFX™ para la purificación de ADN de PCR y se llevaron a cabo con un aparato GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems). Las construcciones plasmídicas se transfirieron de *E. coli* a *L. bulgaricus* VI104 y *S. thermophilus* LMD9 por electroporación (Serror y col., 2002, Appl. Environ. Microbiol., 68: 46-52; Somkuti, G. A. y D. H. Steinberg, 1988, Biochimie, 70: 579-85).

10 [0089] La secuenciación de ADN se efectuó con un analizador genético automatizado 3100 (Applied Biosystems).

Plásmidos

15 [0090] Todos los plásmidos y cepas usados en este trabajo se listan en la tabla 1. El plásmido pMR2 corresponde a pVI165 (un transportador de *E. coli* a bacterias lácticas, construido en el laboratorio) con un fragmento SacI-SacI de 1.577 pb que contiene el gen *araA* US100 que codifica una L-arabinosa-isomerasa denominada L-AI US100 sin promotor (Rhimy y Bejar, 2006, Biochim. Biophys. Acta, 1760: 191-9). El plásmido pMR3 corresponde a pVI165 con un fragmento de 147 pb que contiene p_{hibA} , un fuerte promotor constitutivo de *L. bulgaricus* ATCC11842 (Serror y Chouayekh, sin publicar; Guchte y col., 2006, PNAS). El plásmido pMR4 corresponde a pMR3 con el gen *araA* US100 aislado de pMR1 (fragmento SacI-SacI) detrás del promotor p_{hibA} .

Tabla 1: cepas bacterianas y plásmidos

Cepas	Características	Fuente/referencia
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD9	Cepa tipo	Bolotin y col., Nat. Biotechnol., 2004, 22(12): 1554-8.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	Cepa tipo	van de Guchte y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103(24): 9274-9.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> VI104		Serror y col., Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68(1): 46-52
Plásmidos		
pVI165	pVI1055 (Serror y col., Microbiology, 2003, 149: 1503-11) con una agrupación de tres terminadores de transcripción (de pVI152)	Chouayekh y van de Guchte, sin publicar
pMR2	<i>araA</i> US100 (Rhimy y Bejar, 2006, BBA, 1760: 191-9) clonado en pVI165	Este trabajo
pMR3	Promotor p_{hibA} clonado en pVI165	Este trabajo
pMR4	<i>araA</i> US100 de pMR1 clonado en pMR3 detrás del promotor p_{hibA}	Este trabajo

25

Preparación de extractos enzimáticos crudos

[0091] Para las bacterias lácticas, los cultivos realizados en los medios apropiados se centrifugaron y los sedimentos se suspendieron en tampón MOPS 100 mM (pH 7,5). Sin embargo, en los cultivos en leche desnatada, correspondientes al cultivo independiente o cocultivo de las cepas de *L. bulgaricus*/pMR4 y *S. thermophilus*/pMR4, antes de la centrifugación se les añadieron 0,3 volúmenes de Tris-citrato de sodio 1M a los cultivos. Después, las células se centrifugaron y los sedimentos celulares se lavaron tres veces con el tampón de extracción (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,4). A continuación, el sedimento recogido se suspendió en el tampón MOPS 100 mM (pH 7,5).

35 [0092] La rotura de las células se llevó a cabo con un aparato rompedor de células por batido con miniesferas 8TM y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15.000 rpm durante 30 min a 4 °C.

Cuantificación, electroforesis e identificación de proteínas por espectrometría de masas

[0093] La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976, Anal. Biochem., 72: 248-254). Las muestras de proteínas se separaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %, de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970, Nature, 227: 680-5). Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie Biosafe (BioRad).

5

[0094] Las proteínas extraídas, correspondientes a cada cepa recombinante, se separaron por SDS-PAGE. Después de la tinción con azul de Coomassie Biosafe (BioRad), las bandas con el peso molecular esperado se escindieron del gel y se lavaron en acetonitrilo / hidrogenocarbonato de amonio 50 mmol/l (v/v). Después, las muestras se agitaron durante 15 min, se secaron al vacío durante 30 min y se les añadieron 0,5 mg de tripsina (Promega) en 25 ml de hidrogenocarbonato de amonio (50 mmol/l). Las muestras se digirieron durante 16 h a 37 °C. Para los análisis de ionización/desorción asistida por matriz con analizador por tiempo de vuelo (MALDI-TOF), se añadieron 2 µl de TFA al 5 % para parar la reacción de tripsinólisis. Las mezclas de péptidos se analizaron mediante una matriz de ácido ciano-4-hidroxycinámico preparada a una concentración de 5 mg/ml en acetonitrilo al 50 % que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %. Los péptidos de la autólisis de la tripsina (842,5 y 2.211,1 Da) se usaron como calibrantes internos. Se seleccionaron los péptidos en el intervalo de tamaños de 700-4.000 Da.

[0095] Los péptidos se analizaron con un espectrómetro de masas para MALDI-TOF Voyager DE STR (Applied Biosystems). Los espectros MS/MS registrados se compararon con las fragmentaciones teóricas de una proteína araA US100 (número de acceso: CAI29261) tripsinolizada mediante el algoritmo Sequest incorporado en el software BioWorks (versión 2, Thermo Finnigan).

20

Análisis de la actividad de la L-arabinosa-isomerasa

[0096] La actividad de la L-arabinosa-isomerasa se midió mediante la determinación de la cantidad de L-ribulosa o D-tagatosa producidas. En las condiciones estándar, la mezcla de reacción contenía CoCl₂ 0,2 mM, MnSO₄ 1 mM, 50 µl de extracto enzimático crudo en una dilución adecuada, L-arabinosa (D-galactosa) 5 mM y tampón MOPS 100 mM (pH 7,5) para completar un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción se incubó a 80 °C durante 1 min y 10 min, respectivamente, para L-arabinosa y D-galactosa. Después, las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo para parar las reacciones. La L-ribulosa (o D-tagatosa) generada se determinó por el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico y la absorbancia se midió a 560 nm (Dische y Borenfreund, 1951, J. Biol. Chem., 192: 583-7). La producción de D-tagatosa también se analizó mediante cromatografía iónica de alto rendimiento (HPLC) con una columna Polypore CA (250 x 4,6 mm). Los productos se separaron por elución isocrática con agua a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min y se detectaron con un detector del índice de refracción (SHIMADZU, detector del índice de refracción RID-10A). Como estándares se usaron disoluciones de 10 /l de lactosa, D-galactosa y D-tagatosa. Una unidad de actividad de la L-arabinosa-isomerasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de cetozúcar por minuto en las condiciones especificadas anteriormente.

30

35

Detección de la producción in vivo de D-tagatosa conferida por la expresión de la L-AI US100

40

[0097] Las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* que contenían pMR4 se cultivaron, respectivamente, en los medios MRS y M17 con D-galactosa en una concentración final de 10 g/l. El medio se inoculó con un cultivo incubado durante la noche a una DO_{600 nm} de 0,1. Se recogieron muestras cada hora, hasta las 12 h, a lo que siguió la monitorización de la actividad de la L-AI US100 en el sobrenadante por el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico. La producción de D-tagatosa se analizó también por HPLC.

45

Detección de la producción in vitro de D-tagatosa en leche con el uso de la L-AI US100

[0098] La L-AI US100 purificada (3 mg/ml) se añadió a leche enriquecida con D-galactosa (concentración final de 10 g/l). Alternativamente, la enzima purificada se añadió al cocultivo de las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* naturales y recombinantes efectuado en la leche. La cinética de la bioconversión de la D-galactosa se investigó hasta las 20 h. Las proteínas de la leche se eliminaron mediante una etapa de clarificación, consistente en la adición de un volumen, respectivamente, de disoluciones de acetato de cinc al 30 % y ferrocianuro de potasio al 15 % (p/v), seguida de una centrifugación a 15.000 durante 20 min. Después, los azúcares se recuperaron en la fase acuosa. La producción de D-tagatosa en esta fracción del sobrenadante se demostró mediante el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico y se confirmó por HPLC.

50

55

- Resultados*Producción de L-AI US100 activa en/de iniciadores de yogur*

5 **[0099]** El plásmido pMR4 que contiene la fusión $p_{\text{hibA}}:araA$ US100 y los dos controles negativos pMR2 (que contiene el gen *araA* sin promotor) y pMR3 (que contiene p_{hibA} solamente) se introdujeron en los iniciadores de yogur *L. bulgaricus* (cepa VI104) y *S. thermophilus* (cepa LMD9), que no metabolizan la galactosa durante la fermentación de la lactosa. La expresión de la actividad de la L-AI se analizó en extractos crudos de las cepas resultantes cultivadas en medios sintéticos y en leche mediante el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico
10 (Materiales y procedimientos).

[0100] Después del cultivo en medios sintéticos, la actividad de la L-AI solo se detectó en los extractos celulares crudos preparados a partir de las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* que contenían pMR4 ($p_{\text{hibA}}:araA$ US100), es decir, MRS9 y MRS12, respectivamente. Las actividades medidas fueron $25 \pm 0,32$ y $15 \pm 0,7$ U/mg para *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, respectivamente (tabla 2).
15

Tabla 2: actividad de la L-AI US100 expresada por las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* cultivadas en medios sintéticos o en leche

Descripción de la cepa	Designación de la cepa	Actividad de la L-AI US100 (U/mg) en medio de laboratorio	Actividad de la L-AI US100 (U/mg) en leche
VI104/pMR2	MRS7	ND	ND
VI104/pMR3	MRS8	ND	ND
VI104/pMR4	MRS9	$25 \pm 0,32$	$21 \pm 0,14$
LMD9/pMR2	MRS10	ND	ND
LMD9/pMR3	MRS11	ND	ND
LMD9/pMR4	MRS12	$15 \pm 0,7$	$12 \pm 0,18$
VI104/pMR4 y LMD9/pMR4	MRS9 y MRS12	ND	$32 \pm 0,54$
ND: no detectada			

20

[0101] Además de la medición de la actividad de la L-AI *in vitro*, los extractos celulares crudos preparados de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* con los diversos plásmidos pMR2, pMR3 y pMR4 se separaron en SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. En el peso molecular esperado para el monómero de la L-AI US100 (56 kDa), se detectaron nuevas bandas en las muestras correspondientes a las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* que contenían pMR4. Se escindieron estas bandas, así como las correspondientes más débiles en las muestras de control, y se analizaron las proteínas por espectrometría de masas (MS). La L-AI US100 se identificó sin ambigüedad en las bandas procedentes de las cepas que contenían pMR4, mientras que no se detectó en las bandas más débiles obtenidas con los controles negativos.
25

[0102] A continuación, se evaluó la expresión y funcionalidad de la L-AI US100 en leche, el medio de cultivo usual de los iniciadores de yogur. Las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* con pMR4 ($p_{\text{hibA}}:araA$) se cultivaron separadamente o en asociación en leche y se midió la actividad de la L-AI en extractos celulares crudos. En los cultivos de una sola especie, las actividades específicas de la L-AI *in vitro* fueron $21 \pm 0,14$ y $12 \pm 0,18$ U/ml para las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* con pMR4, respectivamente. En el cocultivo, la actividad específica de la L-AI alcanzó reproduciblemente $32 \pm 0,54$ U/mg (tabla 2). Un análisis mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas confirmó la presencia de la L-AI US100 solo en los extractos derivados de los cultivos en leche de las cepas que contenían pMR4.
30
35

[0103] Estas observaciones estuvieron de acuerdo con las medidas de la actividad de la L-AI *in vitro* que claramente demostraron la expresión eficiente de la L-AI-US100 en las dos especies iniciadoras de yogur bajo el control del promotor p_{hibA} .
40

Bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa por cepas que expresan la L-AI US100 en un medio enriquecido con D-galactosa

45

[0104] Para analizar la isomerización de D-galactosa por la L-AI US100 expresada *in vivo*, las cepas

recombinantes de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* se cultivaron en medios de laboratorio enriquecidos con 10 g/l de D-galactosa. Los estudios cinéticos durante el cultivo de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* con pMR4 demostraron que se había formado una nueva cetohexosa en el medio de cultivo (figuras 1-2). Esta cetohexosa, identificada como D-tagatosa por HPLC, se acumuló hasta constituir el 20 % de las cetohexosas totales (es decir, aproximadamente 2 g/l) después de 12 h de fermentación.

Bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa durante la fermentación de la leche

[0105] Después se examinó la bioconversión *in vivo* de la D-galactosa producida durante la fermentación de la leche por medio de los iniciadores BL que expresaban *araA* (MRS9 y MRS12). También se usó como control una muestra fermentada por los iniciadores BL parentales que no mostraban ninguna actividad de L-AI. La composición de azúcares del medio de cultivo se determinó por HPLC en varios tiempos de incubación a 42 °C (tabla 3). La D-galactosa se acumuló en todos los cultivos, pero la D-tagatosa solo se identificó en los cultivos enriquecidos con L-AI, a través de su expresión por los iniciadores BL.

Tabla 3: análisis de la composición de azúcares en leche fermentada por diversos iniciadores de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*

	Tiempo (h)	VI104 y LMD9	MRS9 y MRS12
D-galactosa (g/l)	0	0	0
	10	6,6	3,9
	20	10,2	6,2
D-tagatosa (g/l)	0	0	0
	10	0	0,33
	20	0	0,72

[0106] Teniendo en cuenta que el pH óptimo para la actividad de la L-AI es de aproximadamente 7,5-8, se reflexionó si la acidificación del medio, resultante de la producción de ácido láctico por los iniciadores BL (figuras 1-2), podría afectar a la eficiencia de la L-AI expresada y a la cinética de la conversión en D-tagatosa. Con el fin de investigar el efecto de la acidificación del medio en el rendimiento de la producción de D-tagatosa, las cepas MRS9 y MRS12 se cultivaron en un biorreactor, permitiendo la neutralización del ácido láctico mediante la adición de NaOH (5 N) (figura 3). En este sistema, el rendimiento de bioconversión final fue similar pero la cinética de la producción de D-tagatosa fue mucho más rápida: la máxima cantidad de D-tagatosa se alcanzó después de 9 h, en lugar de 12 h.

[0107] Todos estos resultados establecieron que la enzima L-AI US100 producida por las cepas BL es activa y permite la conversión de D-galactosa en un medio enriquecido con D-galactosa y durante la fermentación de la leche, aunque la enzima esté en el citoplasma bacteriano.

[0108] *Conversión de D-galactosa por el sobrenadante de BL que secretan la L-AI US100.* La cepa L: MG1363 que contiene el plásmido pSec:*araUS100* se usó para expresar el gen *ara* fusionado a la secuencia codificante del péptido señal de Usp45, la principal proteína secretada de *L. lactis*. La cepa de control es una cepa isógena que contiene el mismo plásmido sin la señal de secreción. La actividad de la L-AI se detectó en el sobrenadante del cultivo MG1363/pSec:*araUS100*, lo que indica que la enzima se secreta cuando está asociada a un péptido señal funcional. El sobrenadante se añadió a un medio de cultivo sintético y a leche enriquecida con D-galactosa (10 g/l). La bioconversión de galactosa en D-tagatosa se observó en los dos medios, pero con baja eficiencia; después de 10 h de incubación, en cada una de las muestras se midieron 0,4 g/l de D-tagatosa. Esta observación ha establecido por primera vez que la enzima L-AI puede secretarse al medio cuando su gen se fusiona con la secuencia codificante de un péptido señal y que se secreta al medio en su forma activa. Este modo de producción de la enzima puede ser interesante para la preparación industrial de la misma después de la mejora de la eficiencia de su expresión-secreción.

Ejemplo 2: Producción de D-tagatosa por una L-arabinosa-isomerasa usada como aditivo en leche enriquecida en D-galactosa

2.1 Materiales y procedimientos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

[0109] La cepa bacteriana usada para purificar la L-AI US100 para este trabajo es HB101 con pMR6, un derivado

de pTRC99A que contiene el gen *araA* de *B. stearothermophilus* US100. Esta cepa de *E. coli* se cultivó en medio de Luria Bertani aireado (Difco) a 37 °C (Sambrook y col., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2.^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EE. UU.). Las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* se cultivaron en leche desnatada (leche en polvo de baja temperatura Nilac, NIZO) calentada durante 10 min a 95 °C (Courtin, Monnet y Rul, 2002, Microbiology, 148: 3413-21). Se prepararon cultivos madre de cada cepa de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* después de su crecimiento a 37 °C en leche desnatada enriquecida con un antibiótico, en caso necesario. El crecimiento de los cultivos se detuvo a pH 5,5 y el número de bacterias se estimó por distribución en placas de diluciones apropiadas del cultivo en un medio con agar: para las células de *S. thermophilus* se usó M17-lactosa y para las células de *L. bulgaricus*, MRS-lactosa, pH 5,2. Al final del cultivo, las bacterias se congelaron directamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C. Se prepararon cultivos mixtos de cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* a 42 °C mediante la inoculación de leche desnatada con 10⁶ ufc/ml de los cultivos madre de cada cepa. Periódicamente, se midió el pH de los cultivos y se determinó el número de bacterias según se describe anteriormente.

15 Preparación de extractos crudos y purificación de proteínas

[0110] Las células se recogieron por centrifugación (7.500 x g, durante 10 min) y los sedimentos se suspendieron en tampón HEPES 100 mM, enriquecido, en su caso, con MnCl₂ 1 mM y CoCl₂ 0,2 mM. Después, las suspensiones se incubaron durante dos horas en hielo en presencia de 5 mg/ml de lisozima, PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) 100 mM y 2 µg/ml de pepstatina A. La rotura de las células se llevó a cabo mediante ultrasonidos a 4 °C durante 6 min (pulsaciones de 3 s, amplificación 90) mediante un aparato de ultrasonidos Vibra-Cell™ 72405 y los restos celulares se eliminaron por centrifugación (30.000 x g, durante 30 min a 4 °C). Para la purificación de las proteínas, el extracto celular crudo de cada cepa se calentó (70 °C durante 30 min) y después se centrifugó a 30.000 x g durante 30 min a 4 °C. Las proteínas se precipitaron con una saturación de sulfato de amonio de entre el 60 y el 80 %, se suspendieron en tampón HEPES 100 mM pH 7,5, se concentraron y se desalaron en microconcentradores de centrifugación (Amicon, Inc) con un punto de corte de la membrana de 30 kDa. La purificación hasta homogeneidad se consiguió mediante cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC Amersham Bioscience), con una columna de intercambio aniónico UNO-Q equilibrada con tampón HEPES 100 mM (pH 7,5). Las proteínas se eluyeron con una velocidad de flujo de 3 ml/ml usando un gradiente lineal de NaCl desde 0 a 1 M en el mismo tampón HEPES. Las fracciones reunidas que mostraban actividad de la L-AI se desalaron y concentraron.

Análisis de la actividad de la L-arabinosa-isomerasa

[0111] La actividad de la L-arabinosa-isomerasa se midió mediante la determinación de la cantidad de L-ribulosa o D-tagatosa producidas. En las condiciones estándar, la mezcla de reacción contenía CoCl₂ 0,2 mM, MnSO₄ 1 mM, 50 µl de extracto enzimático crudo en una dilución adecuada, L-arabinosa (D-galactosa) 5 mM y tampón MOPS 100 mM (pH 7,5) para completar un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción se incubó a 80 °C durante 1 min y 10 min, respectivamente, para L-arabinosa y D-galactosa. Después, las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo para parar las reacciones. La L-ribulosa (o D-tagatosa) generada se determinó por el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico y la absorbancia se midió a 560 nm (Dische y Borenfreund, 1951, J. Biol. Chem., 192: 583-7). La producción de D-tagatosa también se analizó mediante cromatografía iónica de alto rendimiento (HPLC) con una columna Polypore CA (250 x 4,6 mm). Los productos se separaron por elución isocrática con agua a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min y se detectaron con un detector del índice de refracción (SHIMADZU, detector del índice de refracción RID-10A). Como estándares se usaron disoluciones de 10 µl de lactosa, D-galactosa y D-tagatosa. Una unidad de actividad de la L-arabinosa-isomerasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de cetozúcar por minuto en las condiciones especificadas anteriormente.

Detección de la producción in vitro de D-tagatosa en leche con el uso de la L-AI US100

[0112] La L-AI US100 purificada (3 mg/ml) se añadió a leche enriquecida con D-galactosa (concentración final de 10 g/l). Alternativamente, la enzima purificada se añadió al cocultivo de las cepas de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* naturales y recombinantes efectuado en la leche. La cinética de la bioconversión de la D-galactosa se investigó hasta las 20 h. Las proteínas de la leche se eliminaron mediante una etapa de clarificación, consistente en la adición de un volumen, respectivamente, de disoluciones de acetato de cinc al 30 % y ferrocianuro de potasio al 15 % (p/v), seguida de una centrifugación a 15.000 durante 20 min. Después, los azúcares se recuperaron en la fase acuosa. La producción de D-tagatosa en esta fracción del sobrenadante se demostró mediante el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico y se confirmó por HPLC.

2.2 Resultados

Isomerización de D-galactosa a D-tagatosa por la adición de la L-AI US100 a leche enriquecida con D-galactosa

5 [0113] Se examinó la posibilidad de añadir la enzima L-AI US100 directamente a la leche para promover la isomerización de D-galactosa a D-tagatosa. Como primera etapa, la enzima purificada se añadió a leche enriquecida con D-galactosa que se incubó a 42 °C. La cinética de la producción de D-tagatosa se siguió mediante el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico. La bioconversión de la D-galactosa aumentó proporcionalmente con el tiempo de incubación y se alcanzó una tasa de conversión máxima del 24 % después de
10 prácticamente 8 h de incubación (figura 4). La conversión de D-galactosa en D-tagatosa se confirmó por análisis de HPLC, que mostró un descenso de la concentración de D-galactosa concomitante con un aumento de la producción de D-tagatosa. Estos resultados y la comparación con la actividad medida en una reacción estándar llevada a cabo a 42 °C y pH 6,5 (no se muestra) demostraron una plena actividad de la enzima L-AI US100 al usarla como aditivo en la leche.

15

Isomerización de la D-galactosa producida durante la fermentación de la leche por la adición de la L-AI US100

[0114] Se examinó la bioconversión *in vivo* de la D-galactosa producida durante la fermentación de la leche por medio de la enzima L-AI US100. La leche se fermentó mediante iniciadores BL en presencia de 1 mg/ml de la enzima L-AI purificada usada como aditivo. El análisis de la composición de azúcares del medio de fermentación mostró una acumulación de D-tagatosa. La composición de azúcares del medio de cultivo se determinó por HPLC en diversos momentos de la fermentación (tabla 4). La D-galactosa se acumuló en todos los cultivos, pero la D-tagatosa se identificó solamente en los cultivos enriquecidos con la L-AI por adición de la enzima purificada.

25 Tabla 4: análisis de la composición de azúcares en leche fermentada por BL con la L-AI US100. Los iniciadores BL son *L. bulgaricus* V1104 y *S. thermophilus* LMD9.

	Tiempo (h)	Cepas iniciadoras solamente	Iniciador y enzima (mg/ml)			
			1	2	3	4
D-tagatosa (g/l)	0	0	0	0	0	0
	4	0	0,3	0,5	0,6	0,5
	6	0	0,6	0,8	0,9	0,7
	10	0	1,5	1,7	2,1	1,7
	20	0	2,3	2,3	2,7	2,3

30 *Optimización de la concentración de enzima necesaria para la producción de D-tagatosa durante la fermentación de la leche*

[0115] Se investigó la producción de D-tagatosa por la adición de la L-AI US100 purificada. De hecho, la concentración de la proteína añadida al cultivo se varió entre 1 y 4 mg/ml. Los resultados obtenidos indicaron que la cinética de la conversión de D-galactosa aumentó proporcionalmente a la concentración de la proteína hasta 3 mg/l.
35 Por encima de esta concentración, la adición de concentraciones mayores de la enzima no produjo ningún efecto notable (tabla 4).

[0116] En conjunto, estos resultados establecen por primera vez que una L-arabinosa-isomerasa usada como aditivo durante la fermentación de la leche convierte eficientemente la D-galactosa producida por la fermentación en
40 D-tagatosa.

Ejemplo 3: bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa en leche por derivados de la L-arabinosa-isomerasa

3.1 Materiales y procedimientos

45

Cepas bacterianas, medios, plásmidos y condiciones de cultivo

[0117] Para la purificación de la L-arabinosa-isomerasa y sus derivados, se usó *Escherichia coli* HB101 (F *hsdS20 ara-1 recA13 proA12 lacY1 galK2 rpsL20 mtl-1 oxyI-5*) como cepa hospedadora deficiente en *araA*. El cultivo de las
50 cepas de *E. coli*, con el gen natural y mutado, se llevó a cabo en el medio de Luria Bertani (LB) (Sambrook y col.,

1989, cita anterior) que se enriqueció en caso necesario con ampicilina (100 µg/ml) e IPTG (160 µg/ml). El plásmido pMR5, que contiene el gen *araA* US100 natural (Rhimí y Bejar, Biochim. Biophys. Acta, 1760 (2006) 191), se usó como molde y para la producción de la proteína L-AI US100 natural. El plásmido pMR7 contiene el gen *araA* S71P, pMR35 contiene el gen *araA* N175H, pMR21 contiene el gen *araA* Q268K y pMR6 contiene el gen *araA* N175 Q268K.

PCR y manipulación del ADN

[0118] Las reacciones en cadena de la polimerasa se llevaron a cabo en un aparato Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Las mezclas de la reacción de amplificación (50 µl) contenían el tampón de amplificación para *pfu* (polimerasa de ADN Turbo), (NH₄)₂SO₄ 10 mM, 100 ng de cada cebador, 50 ng del ADN molde y 2 unidades de la enzima *pfu* (Appligene). Los parámetros de los ciclos fueron 94 °C durante 5 min, seguidos de 40 ciclos a 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 60 s y 72 °C durante 120 s. La preparación del ADN plasmídico, la digestión con endonucleasas de restricción y la separación de fragmentos por electroforesis en gel de agarosa se llevaron a cabo según se describe en Sambrook y col. (1989, cita anterior).

Construcción de derivados de la L-arabinosa-isomerasa

[0119] Todos los derivados de la L-arabinosa-isomerasa se generaron por mutagénesis dirigida mediante PCR (según se describe a continuación para las mutaciones N175H y Q268K y con el kit de mutagénesis dirigida Quick change II XL (Stratagene) para S71P y el mutante doble N175H Q268K), con la secuencia codificante de la L-AI US100 natural en el plásmido pRM5 como molde. Por lo tanto, se diseñaron dos cebadores externos no mutagénicos, F-*araA* y R-*araA*, y para cada derivado, dos cebadores internos complementarios que contenían la mutación deseada (tabla 5).

Tabla 5: Oligonucleótidos usados para mutagénesis dirigida. Las secuencias nucleotídicas correspondientes a los aminoácidos mutados están subrayadas.

Designación	Conjunto de cebadores
FaraA	GTGAACGGGGAGGAGCAATG (SEQ ID NO :3)
RaraA	GAAATCTTACCGCCCCGCC (SEQ ID NO :4)
S71P D	GAATGGAATCGCGATCCGGTGTTCGGTTCCCA (SEQ ID NO :7)
S71P R	TGGGAACGAAACACCGGATCGCGATTCCATTC (SEQ ID NO :8)
N175H D	GCGTTTGCGGAAAGCCGCAACCTAAAAGTGGCTCGT (SEQ ID NO :9)
N175H R	ACGAGCCACTTTTAGGTTGCGGCTTTCGCAAACGC (SEQ ID NO :10)
Q268K D	GCCTTTTGGAAAGACGGGAAC (SEQ ID NO :5)
Q268K R	GTTCCCGTCTTTCAAAAAGGC (SEQ ID NO :6)

[0120] A continuación, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR independientes y los fragmentos resultantes se amplificaron usando pMR5 como molde con los cebadores correspondientes para cada reacción. Los fragmentos resultantes de las dos PCR se extrajeron separadamente y después se llevó a cabo una tercera amplificación en una mezcla que contenía estos fragmentos en presencia de los cebadores externos. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit GFX™ para la purificación de ADN de PCR y bandas de geles (Amersham Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0121] Los fragmentos de ADN purificados se clonaron en un vector pUT57, linealizado previamente con la enzima de restricción *SmaI*, y se transformaron en la cepa HB101. Los transformantes se distribuyeron en placas con medio LB enriquecido con ampicilina (100 µg/ml) e IPTG (160 µg/ml). Las colonias obtenidas se analizaron por restricción y las mutaciones se confirmaron por secuenciación de ADN con un secuenciador automatizado de ADN (Applied Biosystems).

Preparación de extractos crudos y purificación de proteínas

[0122] Las células se recogieron por centrifugación (7.500 x g, durante 10 min) y los sedimentos se suspendieron en tampón HEPES 100 mM, enriquecido, en su caso, con MnCl₂ 1 mM y CoCl₂ 0,2 mM. Después, las suspensiones se incubaron durante dos horas en hielo en presencia de 5 mg/ml de lisozima, PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) 100 mM y 2 µg/ml de pepstatina A. La rotura de las células se llevó a cabo mediante ultrasonidos a 4 °C durante 6 min (pulsaciones de 3 s, amplificación 90) mediante un aparato de ultrasonidos Vibra-

Cell™ 72405 y los restos celulares se eliminaron por centrifugación (30.000 x g, durante 30 min a 4 °C).

[0123] Para la purificación de las proteínas, el extracto celular crudo de cada cepa se calentó (70 °C durante 30 min) y después se centrifugó a 30.000 x g durante 30 min a 4 °C. Las proteínas se precipitaron con una saturación de sulfato de amonio de entre el 60 y el 80 %, se suspendieron en tampón HEPES 100 mM pH 7,5, se concentraron y se desalaron en microconcentradores de centrifugación (Amicon, Inc) con un punto de corte de la membrana de 30 kDa. La purificación hasta homogeneidad se consiguió mediante cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC Amersham Bioscience), con una columna de intercambio aniónico UNO-Q equilibrada con tampón HEPES 100 mM (pH 7,5). Las proteínas se eluyeron con una velocidad de flujo de 3 ml/ml usando un gradiente lineal de NaCl desde 0 a 1 M en el mismo tampón HEPES. Las fracciones reunidas que mostraban actividad de la L-AI se desalaron y concentraron.

Cuantificación y electroforesis de proteínas

[0124] La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford con albúmina de suero bovino como estándar (Bradford, Anal. Biochem., 72 (1976) 248). Las muestras de enzimas purificadas se separaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %, de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970, Nature, 227: 680). Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (BioRad).

20

Ensayos enzimáticos y determinación de los efectos de la temperatura y el pH

[0125] La actividad de la L-arabinosa-isomerasa se midió mediante la determinación de la cantidad de L-ribulosa o D-tagatosa formadas en la reacción siguiente. La mezcla de reacción estándar contenía CoCl₂ 0,2 mM, MnSO₄ 1 mM, 50 µl de la preparación enzimática en una dilución adecuada, L-arabinosa o D-galactosa 5 mM y tampón MOPS 100 mM (pH 7,5) para completar un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción se incubó a 80 °C durante 1 min y 10 min, respectivamente, para L-arabinosa y D-galactosa, a lo que siguió el enfriamiento de las muestras en hielo para parar las reacciones. La L-ribulosa (o D-tagatosa) generada se determinó por el procedimiento de la cisteína, carbazol y ácido sulfúrico y la absorbancia se midió a 560 nm (Dische y Borenfreund, J. Biol. Chem., 192 (1951) 583). La producción de D-tagatosa también se confirmó mediante cromatografía iónica de alto rendimiento (HPLC) con una columna Polypore CA (250 x 4,6 mm). Los productos se separaron por elución isocrática con agua a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min y se detectaron con un detector del índice de refracción (SHIMADZU, detector del índice de refracción RID-10A). Como estándares se usaron disoluciones de 5 µl de lactosa, D-galactosa y D-tagatosa. El perfil de termoactividad se estudió llevando a cabo la reacción estándar (descrita anteriormente) a temperaturas comprendidas entre 30 y 90 °C. El efecto del pH se midió llevando a cabo la reacción estándar (descrita anteriormente) a pH en el intervalo de 4,0 a 9,0 (4 a 6 ajustado con acetato, 6,0 a 8,0 mediante tampón MOPS y 8,0 a 9,0 mediante tampón de glicina).

3.2 Resultados

40

Diseño, purificación y caracterización bioquímica de mutantes

[0126] Las condiciones óptimas para la actividad de la L-AI US100 (80 °C y pH 7,5) no siempre pueden adaptarse a las condiciones de procesamiento de los alimentos, por ejemplo, en el proceso de fermentación de la leche por iniciadores BL (42 °C a 44 °C y pH entre 6,5 y 4,5). Por consiguiente, se investigaron las propiedades bioquímicas de diversos derivados de la L-AI. Los restos catalíticos implicados en la reacción de isomerización catalizada por la L-AI US100 y aquellos implicados en la afinidad de la enzima se habían identificado previamente (Rhim y col., J. Bacteriol., 2007, 189(9): 3556-63). Con el fin de investigar la relación entre la estructura y la función de la L-AI US100, se generaron varios derivados de esta enzima por mutagénesis dirigida mediante PCR. La actividad de varios de estos derivados de la L-AI se examinó a diversas temperaturas y pH.

[0127] El estudio de la actividad a diferentes temperaturas demostró que las proteínas L-AI US100, L-AI US100 S71P y L-AI US100 Q268K tenían perfiles similares y una actividad óptima a 80 °C. Por el contrario, L-AI US100 N175H y el mutante doble L-AI US100 N175H Q268K mostraron patrones diferentes, con temperaturas óptimas de 60-70 °C y 55-60 °C, respectivamente (figura 5). Con respecto al pH óptimo para la actividad, la L-AI US100 y sus derivados L-AI US100 S71P y L-AI US100 N175H mostraron de manera similar la máxima actividad a un pH en el intervalo entre 7,5 y 8,0, mientras que otros derivados como L-AI US100 Q268K y el mutante doble L-AI US100 N175H Q268K presentaron un pH óptimo de 6,0-6,5 y 7,0, respectivamente (figura 6). Además, los valores de la actividad relativa de los mutantes L-AI N175H Q268K y L-AI Q268K aumentaron desde el pH 5,0 a 6,5 en más del 15

% y en el 25 %, respectivamente, en comparación con los de la L-AI US100 natural.

[0128] Estos resultados demostraron que la mutación N175H desplazó la temperatura óptima de la enzima desde 80 °C hasta 60-70°C sin afectar al pH óptimo de la enzima, mientras que la mutación Q268K desplazó significativamente el pH óptimo de la enzima mutada desde 7,5-8, según se observa en la L-AI US100 natural, hasta 6,0-6,5, sin modificar la temperatura óptima de la enzima. En otras palabras, la mutación N175H mejoró la mesofilia de la enzima, mientras que la mutación Q268K aumentó la tolerancia a la acidez. El efecto de estas mutaciones se acumula en el derivado L-AI US100 N175H Q268K, que es a la vez más mesófilo y más tolerante a la acidez que la enzima L-AI US100 natural. Aunque la mutación S71P no tiene ningún efecto sobre los dos parámetros examinados anteriormente, puede resultar (al igual que otras mutaciones de la L-AI) beneficiosa para otros parámetros bioquímicos y para aplicaciones determinadas.

Producción de D-tagatosa por derivados de la L-AI en leche enriquecida con D-galactosa

[0129] Se examinó la conversión de D-galactosa (10 g/l) en la leche con cuatro de los derivados de la L-AI US100 (3 mg/ml). Se recogieron muestras en diversos momentos durante la incubación a 42 °C y se midió la cantidad de D-tagatosa producida (tabla 6). Aunque a las 20 h, el rendimiento de conversión final fue similar para todas las enzimas, la producción de D-tagatosa fue más rápida en las muestras que contenían L-AI N175H Q268K o L-AI N175H que en las muestras con L-AI Q268K o L-AI US100. Esta observación está totalmente de acuerdo con las propiedades bioquímicas de los derivados de la L-AI. La mesofilia de L-AI N175H y L-AI N175H Q268K permite, de hecho, a estas enzimas ser más activas en las condiciones examinadas, es decir, pH 6,5 y 42 °C, que L-AI US100 y L-AI Q268K, tolerante a la acidez.

Tabla 6: producción de D-tagatosa por la L-AI US100 y cuatro de sus derivados en leche enriquecida con D-galactosa

Tiempo (h)	L-AI	S71P	N175H	Q268K	N175H Q268K
0	0	0	0	0	0
4	0,6	0,6	0,9	0,6	1,0
6	0,9	0,9	1,3	1,1	1,7
8	1,0	1,0	1,7	1,4	2,0
10	1,1	1,1	1,9	1,7	2,1
20	2,3	2,3	2,4	2,3	2,4

Producción de D-tagatosa por derivados de la L-AI durante la fermentación de la leche por BL

[0130] A continuación, se examinó la conversión de D-galactosa en D-tagatosa por la L-AI US100 y cada uno de sus cuatro derivados (S71P, Q268K, N175H, N175H Q268K) durante la fermentación de la leche por los iniciadores BL *L. bulgaricus* V1104 y *S. thermophilus* LMD9. Se recogieron muestras en diversos momentos de la fermentación para medir la cantidad de D-tagatosa producida y el pH (tabla 7). Aunque a las 20 h, el rendimiento de conversión final fue similar para todas las enzimas, la producción de D-tagatosa fue más rápida en las muestras que contenían L-AI N175H, L-AI N175H Q268K o L-AI Q268K que en las muestras con L-AI US100 o L-AI S71P. La conversión de D-galactosa resultó ser más rápida con L-AI N175H (más mesófila) que con L-AI Q268K (más tolerante a la acidez), pero la mejor tasa de conversión se observó con L-AI N175H Q268K, el mutante doble de la L-AI que mostró a la vez una temperatura óptima inferior y un pH óptimo inferior para su actividad en comparación con la L-AI US100. Estos datos demuestran que las modificaciones de las propiedades bioquímicas de al menos tres derivados de la L-AI mejoran su rendimiento durante un proceso específico como la producción de yogur o leche fermentada.

Tabla 7: producción de D-tagatosa (Tag. en g/l) por diversas L-AI durante la fermentación de la leche

Tiempo (h)	L-AI		S71P		N175H		Q268K		N175H Q268K	
	pH	Tag.	pH	Tag.	pH	Tag.	pH	Tag.	pH	Tag.
0	6,6	0	6,6	0	6,6	0	6,6	0	6,6	0
4	5,7	0,5	5,7	0,5	5,7	0,8	5,7	0,7	5,8	1,1
8	5,4	0,7	5,4	0,7	5,4	1,2	5,3	1,0	5,5	1,6
6	5	0,9	5	0,9	5	1,7	4,9	1,5	5,1	1,9
10	4,9	1,2	4,9	1,2	5	2,1	4,8	2,0	4,8	2,4

20	4,9	2,5	4,9	2,5	4,9	2,5	4,8	2,5	4,7	2,5
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0131] En conjunto, en este documento se describen la construcción, purificación y uso de nuevos derivados de la L-AI US100. Una simple caracterización bioquímica demostró que algunos mutantes tienen temperatura y pH óptimos que difieren de los de la L-AI US100 natural. De acuerdo con estas observaciones, los experimentos en leche confirmaron que estos derivados de la L-AI US100 pueden ser más eficientes para la producción de D-tagatosa que la enzima auténtica. Al mismo tiempo, este trabajo es un primer ejemplo y una clara demostración de que la manipulación de la enzima L-AI mediante mutagénesis al azar o dirigida puede permitir la generación de derivados de la L-AI útiles, más adecuados para las condiciones de un proceso industrial dado y, por consiguiente, muy prometedores para su aplicación industrial.

Ejemplo 4: bioconversión por L-arabinosa isomerasa en leche enriquecida en galactosa por hidrólisis enzimática de la lactosa

4.1 Materiales y procedimientos

Cepas

[0132] En este ejemplo se usaron dos cepas de *E. coli*. En la cepa HB101 que contenía el plásmido pMR4:araAUS100, el gen *araA* US100 natural está bajo el control del promotor constitutivo p_{hibA} . La otra cepa corresponde a HB101 con un gen *araA* mutado que codifica el mutante doble N175H Q268K bajo el control de un promotor inducible por IPTG (p_{lac}) en el plásmido pUT57.

Inmovilización de los microorganismos y las enzimas

[0133] El cultivo de las cepas de *E. coli* se incubó hasta una DO a 600 nm de 3. Entonces, las células se centrifugaron y el sobrenadante se descartó. Después de una etapa de secado, el sedimento se pesó y se suspendió en el tampón MOPS (pH 7,5, 100 mM). Después se añadió alginato a la suspensión celular para obtener concentraciones finales de 30 g/l para las células y el 3 % para el alginato. Entonces se formaron esferas de alginato que contenían las células como pequeñas gotas.

Hidrólisis de la lactosa en la leche

[0134] La lactosa natural de una muestra de leche se hidrolizó por la adición de β -galactosidasa procedente de *Lactobacillus bulgaricus* ATCC11842. La cinética de la producción de D-glucosa se monitorizó en función del tiempo; a las 25 h de incubación se obtuvieron 25 g/l de D-glucosa. Dado que la escisión de la lactosa da lugar a cantidades equimolares de glucosa y galactosa, de esta medición se dedujo que la cantidad de D-galactosa era también de 25 g/l.

4.2 Resultados

Conversión de D-galactosa después de la hidrólisis enzimática de la lactosa en la leche mediante microorganismos que expresan la arabinosa-isomerasa atrapada en esferas de alginato

[0135] La leche se enriqueció en D-galactosa por la hidrólisis enzimática de la lactosa a D-glucosa y D-galactosa en una relación uno a uno. A las 25 h, la concentración de la glucosa alcanzó 25 g/l. En este momento, se añadieron las esferas de alginato que contenían las cepas que expresaban la L-AI US100 natural o el mutante L-AI N175H Q268K a la leche tratada. Entonces se siguió la cinética de la bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa durante la incubación a tres temperaturas: 60, 65 y 70 °C (figuras 7 y 8). Para la enzima natural se obtuvo una tasa de conversión del 48 % a la mayor temperatura examinada después de 20 h de incubación, mientras, según lo esperado, el mutante doble de la L-AI, que es menos termófilo que la enzima natural, mostró una tasa de conversión máxima inferior en el mismo punto temporal (38 %).

[0136] En conjunto, estos datos establecen por primera vez que células que expresan la L-AI y están incorporadas en una matriz pueden usarse eficientemente para la producción de D-tagatosa en leche enriquecida en D-galactosa por un tratamiento enzimático. Además, este tipo de planteamiento podría permitir el uso repetido de la matriz. En consecuencia, la estabilidad general de la enzima puede ser un factor crítico en este caso.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0137]

- <110> INRA
- 5 <120> L-arabinosa-isomerasa para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa en un producto lácteo que contiene D-galactosa
- <130> BET 07P0458
- 10 <160> 10
- <170> PatentIn, versión 3.4
- 15 <210> 1
<211> 1.491
<212> ADN
<213> *Bacillus stearothermophilus*, cepa US100
- 20 <220>
<221> Secuencia codificante
<222> (1)..(1.491)
<223> L-arabinosa-isomerasa
- 25 <400> 1

ES 2 542 506 T3

atg Met 1	ctg Leu	tca Ser	tta Leu	cgt Arg 5	cct Pro	tat Tyr	gaa Glu	ttt Phe	tgg Trp 10	ttt Phe	gtg Val	aca Thr	gga Gly	agt Ser 15	cag Gln	48
cac His	ttg Leu	tac Tyr	gga Gly 20	gaa Glu	gaa Glu	gcg Ala	tta Leu	aaa Lys 25	caa Gln	gtc Val	gaa Glu	gaa Glu	cat His 30	tca Ser	aga Arg	96
atc Ile	atg Met	gtc Val 35	aat Asn	gaa Glu	tgg Trp	aat Asn	cgc Arg 40	gat Asp	tcg Ser	gtg Val	ttt Phe	ccg Pro 45	ttc Phe	cca Pro	ttc Phe	144
gtt Val	ttc Phe 50	aaa Lys	tca Ser	gtc Val	gtg Val	acg Thr 55	acg Thr	cca Pro	gag Glu	gaa Glu	atc Ile 60	cgg Arg	cgc Arg	gtt Val	tgc Cys	192
ctt Leu 65	gag Glu	gcg Ala	aat Asn	gcg Ala	agc Ser 70	gaa Glu	caa Gln	tgc Cys	gct Ala	ggg Gly 75	gtc Val	atc Ile	act Thr	tgg Trp	atg Met 80	240
cat His	aca Thr	ttc Phe	tcg Ser	cca Pro 85	gcg Ala	aaa Lys	atg Met	tgg Trp	att Ile 90	ggc Gly	ggc Gly	ctt Leu	ttg Leu	gag Glu 95	ttg Leu	288
aga Arg	aaa Lys	ccg Pro	tta Leu 100	ttg Leu	cat His	ctt Leu	cac His	acc Thr 105	cag Gln	ttt Phe	aac Asn	cg Arg	gat Asp 110	att Ile	ccg Pro	336
tgg Trp	gac Asp	agc Ser 115	atc Ile	gat Asp	atg Met	gac Asp	ttt Phe 120	atg Met	aac Asn	tta Leu	aac Asn	caa Gln 125	tcg Ser	gct Ala	cac His	384
ggt Gly	gac Asp 130	cg Arg	gaa Glu	tac Tyr	gga Gly	ttt Phe 135	atc Ile	ggc Gly	gcg Ala	aga Arg	atg Met 140	ggc Gly	gtg Val	gcc Ala	cgg Arg	432
aaa Lys 145	gtg Val	gtg Val	gtc Val	ggg Gly	cac His 150	tgg Trp	gaa Glu	gac Asp	cca Pro	gaa Glu 155	gtc Val	cg Arg	gag Glu	cgg Arg	ctg Leu 160	480
gcg Ala	aaa Lys	tgg Trp	atg Met	cgg Arg 165	acg Thr	gct Ala	gtc Val	gcg Ala	ttt Phe 170	gcg Ala	gaa Glu	agc Ser	cg Arg	aac Asn 175	cta Leu	528

ES 2 542 506 T3

aaa Lys	gtg Val	gct Ala	cgt Arg 180	ttt Phe	ggc Gly	gac Asp	aac Asn	atg Met 185	cgt Arg	gaa Glu	gtg Val	gct Ala	gtg Val 190	acg Thr	gaa Glu	576
ggg Gly	gac Asp	aaa Lys 195	gtc Val	gga Gly	gcg Ala	caa Gln	att Ile 200	caa Gln	ttc Phe	ggc Gly	tgg Trp	tcg Ser 205	gtc Val	aac Asn	ggc Gly	624
tat Tyr	ggc Gly 210	atc Ile	ggg Gly	gat Asp	ttg Leu	gtg Val 215	caa Gln	tac Tyr	atc Ile	cgc Arg	gat Asp 220	ggt Val	tct Ser	gaa Glu	caa Gln	672
aaa Lys 225	gtg Val	aac Asn	gag Glu	ttg Leu	ctc Leu 230	gat Asp	gaa Glu	tac Tyr	gag Glu	gag Glu 235	ctg Leu	tac Tyr	gac Asp	att Ile	gta Val 240	720
ccc Pro	gcc Ala	ggc Gly	cgc Arg	caa Gln 245	gaa Glu	ggg Gly	ccc Pro	ggt Val	cgc Arg 250	gaa Glu	tca Ser	att Ile	cgf Arg	gaa Glu 255	cag Gln	768
gcg Ala	cgg Arg	att Ile	gaa Glu 260	ctc Leu	ggg Gly	ctg Leu	aaa Lys	gcc Ala 265	ttt Phe	ttg Leu	caa Gln	gac Asp	ggg Gly 270	aac Asn	ttc Phe	816
act Thr	gcc Ala	ttt Phe 275	acg Thr	acg Thr	acg Thr	ttt Phe	gaa Glu 280	gat Asp	ttg Leu	cac His	ggc Gly	atg Met 285	aag Lys	caa Gln	ctt Leu	864
cca Pro	gga Gly 290	cta Leu	gcg Ala	ggt Val	caa Gln	cgg Arg 295	ctt Leu	atg Met	gca Ala	gag Glu	gga Gly 300	tat Tyr	gga Gly	ttt Phe	ggc Gly	912
ggc Gly 305	gaa Glu	ggc Gly	gac Asp	tgg Trp	aaa Lys 310	acg Thr	gct Ala	gct Ala	ctc Leu	gtt Val 315	cgg Arg	ttg Leu	atg Met	aaa Lys	gtc Val 320	960
atg Met	gcg Ala	gat Asp	ggc Gly	aaa Lys 325	gga Gly	aca Thr	tcg Ser	ttc Phe	atg Met 330	gaa Glu	gac Asp	tac Tyr	acg Thr	tac Tyr 335	cac His	1008
ttt Phe	gag Glu	ctg Leu	ggc Gly 340	aac Asn	gaa Glu	ctg Leu	att Ile	ctt Leu 345	ggc Gly	gcg Ala	cat His	atg Met	ctc Leu 350	gaa Glu	gta Val	1056
tgc Cys	ccg Pro	acg Thr 355	att Ile	gcc Ala	gca Ala	acc Thr	cgg Arg 360	ccg Pro	cgc Arg	atc Ile	gaa Glu	gtc Val 365	cat His	ccg Pro	ctt Leu	1104
tcg Ser	atc Ile 370	ggt Gly	gga Gly	aaa Lys	gaa Glu	gat Asp 375	cca Pro	gcc Ala	cgf Arg	ctc Leu	gtg Val 380	ttt Phe	gac Asp	ggc Gly	ggc Gly	1152
gag Glu 385	ggt Gly	gct Ala	gcg Ala	gtc Val	aat Asn 390	gct Ala	tcg Ser	ttg Leu	att Ile	gac Asp 395	tta Leu	gga Gly	cac His	cgf Arg	ttc Phe 400	1200
cgf Arg	ctc Leu	att Ile	gtc Val	aat Asn 405	gaa Glu	gtc Val	gat Asp	gca Ala	gtg Val 410	aaa Lys	cca Pro	gaa Glu	cat His	gag Glu 415	atg Met	1248
ccg Pro	aaa Lys	ctg Leu	cct Pro 420	ggt Val	gcg Ala	cgf Arg	att Ile	cta Leu 425	tgg Trp	aaa Lys	ccg Pro	cgf Arg	ccg Pro 430	tca Ser	ctc Leu	1296
cgf Arg	gac Asp	tcg Ser 435	gcc Ala	gaa Glu	gca Ala	tgg Trp	att Ile 440	tta Leu	gcc Ala	ggc Gly	gga Gly	gcg Ala 445	cat His	cac His	aca Thr	1344
tgc Tyr	ttc Tyr	tcg Tyr	ttt Tyr	gcg Tyr	gtc Tyr	acg Tyr	gct Tyr	gaa Tyr	cag Tyr	ctg Tyr	caa Tyr	gac Tyr	ttt Tyr	gcg Tyr	gaa Tyr	1392

ES 2 542 506 T3

Cys	Phe	Ser	Phe	Ala	Val	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu	Gln	Asp	Phe	Ala	Glu		
	450					455					460						
atg	gcg	ggc	att	gaa	tgc	gtc	gtg	atc	aat	gaa	cat	acg	tcc	gtc	tcc		1440
Met	Ala	Gly	Ile	Glu	Cys	Val	Val	Ile	Asn	Glu	His	Thr	Ser	Val	Ser		480
465					470					475							
tca	ttc	aag	aac	gaa	cta	aga	tgg	aat	gaa	gta	ttc	tgg	cgg	ggg	cgg		1488
Ser	Phe	Lys	Asn	Glu	Leu	Arg	Trp	Asn	Glu	Val	Phe	Trp	Arg	Gly	Arg		
				485					490					495			
taa																	1491

<210> 2

<211> 496

5 <212> Proteína

<213> *Bacillus stearothermophilus*, cepa US100

<400> 2

Met Leu Ser Leu Arg Pro Tyr Glu Phe Trp Phe Val Thr Gly Ser Gln
 1 5 10 15
 His Leu Tyr Gly Glu Glu Ala Leu Lys Gln Val Glu Glu His Ser Arg
 20 25 30
 Ile Met Val Asn Glu Trp Asn Arg Asp Ser Val Phe Pro Phe Pro Phe
 35 40 45
 Val Phe Lys Ser Val Val Thr Thr Pro Glu Glu Ile Arg Arg Val Cys
 50 55 60
 Leu Glu Ala Asn Ala Ser Glu Gln Cys Ala Gly Val Ile Thr Trp Met
 65 70 75 80
 His Thr Phe Ser Pro Ala Lys Met Trp Ile Gly Gly Leu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Arg Lys Pro Leu Leu His Leu His Thr Gln Phe Asn Arg Asp Ile Pro
 100 105 110
 Trp Asp Ser Ile Asp Met Asp Phe Met Asn Leu Asn Gln Ser Ala His
 115 120 125
 Gly Asp Arg Glu Tyr Gly Phe Ile Gly Ala Arg Met Gly Val Ala Arg
 130 135 140
 Lys Val Val Val Gly His Trp Glu Asp Pro Glu Val Arg Glu Arg Leu
 145 150 155 160
 Ala Lys Trp Met Arg Thr Ala Val Ala Phe Ala Glu Ser Arg Asn Leu
 165 170 175
 Lys Val Ala Arg Phe Gly Asp Asn Met Arg Glu Val Ala Val Thr Glu
 180 185 190

ES 2 542 506 T3

Gly Asp Lys Val Gly Ala Gln Ile Gln Phe Gly Trp Ser Val Asn Gly
 195 200 205

Tyr Gly Ile Gly Asp Leu Val Gln Tyr Ile Arg Asp Val Ser Glu Gln
 210 215 220

Lys Val Asn Glu Leu Leu Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Tyr Asp Ile Val
 225 230 235 240

Pro Ala Gly Arg Gln Glu Gly Pro Val Arg Glu Ser Ile Arg Glu Gln
 245 250 255

Ala Arg Ile Glu Leu Gly Leu Lys Ala Phe Leu Gln Asp Gly Asn Phe
 260 265 270

Thr Ala Phe Thr Thr Thr Phe Glu Asp Leu His Gly Met Lys Gln Leu
 275 280 285

Pro Gly Leu Ala Val Gln Arg Leu Met Ala Glu Gly Tyr Gly Phe Gly
 290 295 300

Gly Glu Gly Asp Trp Lys Thr Ala Ala Leu Val Arg Leu Met Lys Val
 305 310 315 320

Met Ala Asp Gly Lys Gly Thr Ser Phe Met Glu Asp Tyr Thr Tyr His
 325 330 335

Phe Glu Leu Gly Asn Glu Leu Ile Leu Gly Ala His Met Leu Glu Val
 340 345 350

Cys Pro Thr Ile Ala Ala Thr Arg Pro Arg Ile Glu Val His Pro Leu
 355 360 365

Ser Ile Gly Gly Lys Glu Asp Pro Ala Arg Leu Val Phe Asp Gly Gly
 370 375 380

Glu Gly Ala Ala Val Asn Ala Ser Leu Ile Asp Leu Gly His Arg Phe
 385 390 395 400

Arg Leu Ile Val Asn Glu Val Asp Ala Val Lys Pro Glu His Glu Met
 405 410 415

Pro Lys Leu Pro Val Ala Arg Ile Leu Trp Lys Pro Arg Pro Ser Leu
 420 425 430

Arg Asp Ser Ala Glu Ala Trp Ile Leu Ala Gly Gly Ala His His Thr
 435 440 445

Cys Phe Ser Phe Ala Val Thr Ala Glu Gln Leu Gln Asp Phe Ala Glu
 450 455 460

Met Ala Gly Ile Glu Cys Val Val Ile Asn Glu His Thr Ser Val Ser

<220>
<223> Cebador

<400> 7

5 gaatggaatc gcgatccggg gttccgtcc ca 32

<210> 8

<211> 32

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

15

<400> 8

tggaacgaa acaccggatc gcgattccat tc 32

20 <210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador

<400> 9

30 gcgtttgctg aaagccgcaa cctaaaagtg gctcgt 36

<210> 10

<211> 36

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

40 <400> 10

acgagccact ttaggttgc ggcttccgc aaacgc 36

REIVINDICACIONES

1. Uso de una L-arabinosa-isomerasa para la conversión de D-galactosa en D-tagatosa directamente en un producto lácteo que contiene D-galactosa, en el que dicho producto lácteo que contiene D-galactosa se selecciona del grupo que consta de leche, leche enriquecida con D-galactosa, leche que experimenta fermentación láctica, una leche fermentada y leche en la que la lactosa se ha procesado enzimáticamente .
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha L-arabinosa-isomerasa se deriva de una bacteria seleccionada del grupo que consta de una bacteria del género *Thermus*, *Thermotoga*, *Geobacillus*, *Lactobacillus* y *Bacillus*, de *Alicyclobacillus acidocaldarius* y de una bacteria láctica.
3. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha L-arabinosa-isomerasa se selecciona del grupo que consta de AAAI, AAAI-K269E, BHAI, BHAI-E268K, L-AI US100, L-AI US100 que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2, L-AI US100 que comprende una sustitución de N por H en la posición 175 de SEQ ID NO:2 y L-AI US100 que comprende una sustitución de N por H en la posición 175 y de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa se añade al producto lácteo que contiene D-galactosa o se pone en contacto con el mismo.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa se ha transformado para expresar la L-arabinosa-isomerasa o expresa la L-arabinosa-isomerasa de manera natural.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que dicho microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa es una bacteria láctica.
7. Un procedimiento para la conversión de la D-galactosa producida por la fermentación láctica de la leche en D-tagatosa que comprende las etapas de:
- a) adición a la leche de al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa aceptable para el consumo alimentario; y
- b) realización de la fermentación láctica de la leche;
- con lo que la D-galactosa producida en la leche por la fermentación láctica se convierte en D-tagatosa.
8. Un procedimiento para la conversión de la D-galactosa producida por la fermentación láctica de la leche en D-tagatosa, en que el procedimiento comprende las etapas de:
- a) puesta en contacto de la leche con al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa; y
- b) realización de la fermentación láctica de la leche;
- con lo que la D-galactosa producida en la leche durante la fermentación láctica se convierte en D-tagatosa.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que dicho microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa es una bacteria láctica.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicha L-arabinosa-isomerasa se selecciona del grupo que consta de AAAI, AAAI-K269E, BHAI, BHAI-E268K, L-AI US100, L-AI US100 que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2, L-AI US100 que comprende una sustitución de N por H en la posición 175 de SEQ ID NO:2 y L-AI US100 que comprende una sustitución de N por H en la posición 175 y de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que dicho microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa se ha transformado para expresar la L-arabinosa-

isomerasa o expresa la L-arabinosa-isomerasa de manera natural.

12. Un procedimiento para la producción de un producto lácteo fermentado edulcorado que comprende las etapas de:

5

a) adición de al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa aceptable para el consumo alimentario a dicho producto lácteo fermentado; o

10 b) puesta en contacto de dicho producto lácteo que contiene D-galactosa con al menos una L-arabinosa-isomerasa y/o un microorganismo que expresa una L-arabinosa-isomerasa,

con lo que se obtiene un producto lácteo fermentado edulcorado.

13. Un aditivo edulcorante para la leche que comprende una L-arabinosa-isomerasa y/o un
15 microorganismo que expresa una L-arabinosa isomerasa.

14. Una bacteria aceptable para el consumo alimentario que expresa una L-arabinosa-isomerasa exógena.

20 15. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 15, que se ha transformado con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa.

16. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, que es una bacteria láctica.

25 17. La bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en que dicha L-arabinosa-isomerasa se selecciona del grupo que consta de AAAI, AAAI-K269E, BHAI, BHAI-E268K, L-AI US100, L-AI US100 que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2, L-AI US100 que comprende una sustitución de N por H en la posición 175 de SEQ ID NO:2 y L-AI US100 que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 y de N por H en la posición 175 de SEQ ID NO:2.

30

18. Un vector adecuado para la transformación de una bacteria, en que el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una L-arabinosa-isomerasa seleccionada entre las L-arabinosa-isomerasas L-AI US100 que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2, L-AI US100 que comprende una sustitución de N por H en la posición 175 de SEQ ID NO:2 y L-AI US100 que comprende una
35 sustitución de N por H en la posición 175 y de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2.

19. Una L-arabinosa-isomerasa US100 de SEQ ID NO:2 mutada que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2 y/o una sustitución de N por H en la posición 175.

40 20. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica la L-arabinosa-isomerasa US100 de SEQ ID NO:2 mutada que comprende una sustitución de Q por K en la posición 268 de SEQ ID NO:2 y/o una sustitución de N por H en la posición 175.

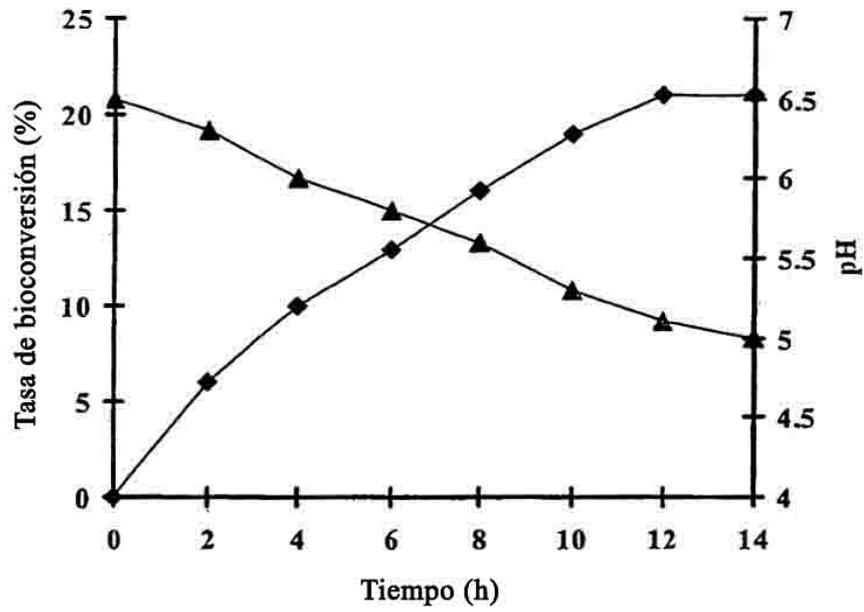


FIG.1

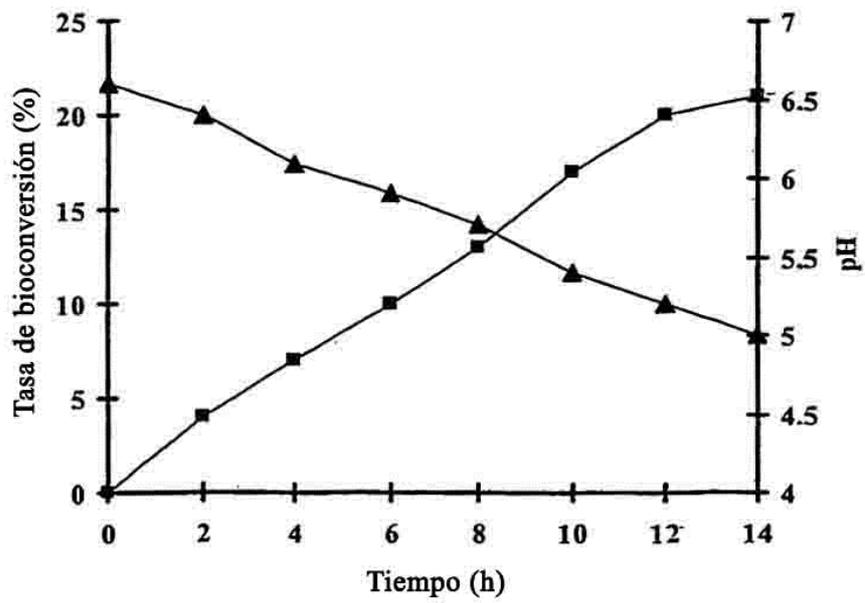


FIG.2

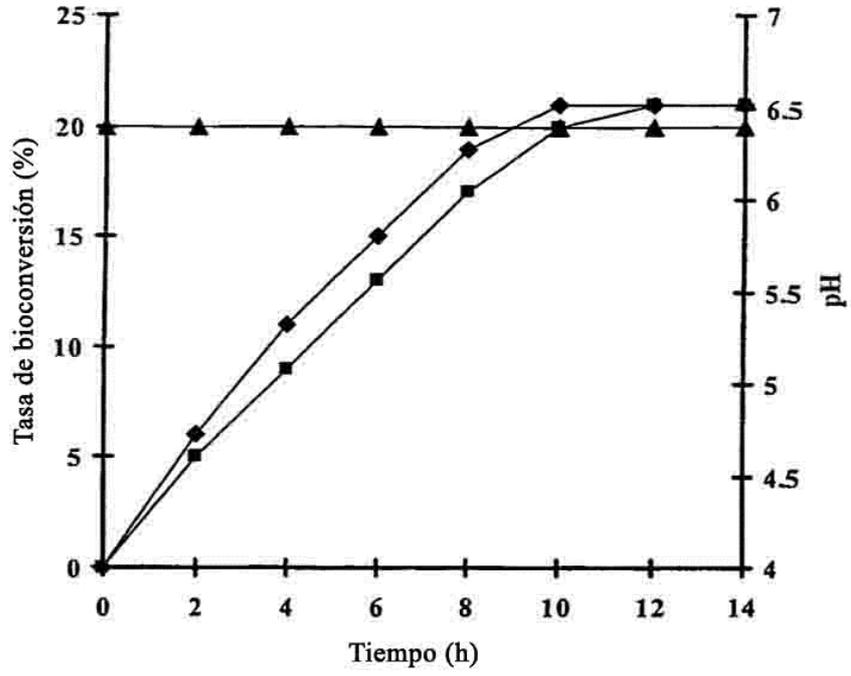


FIG.3

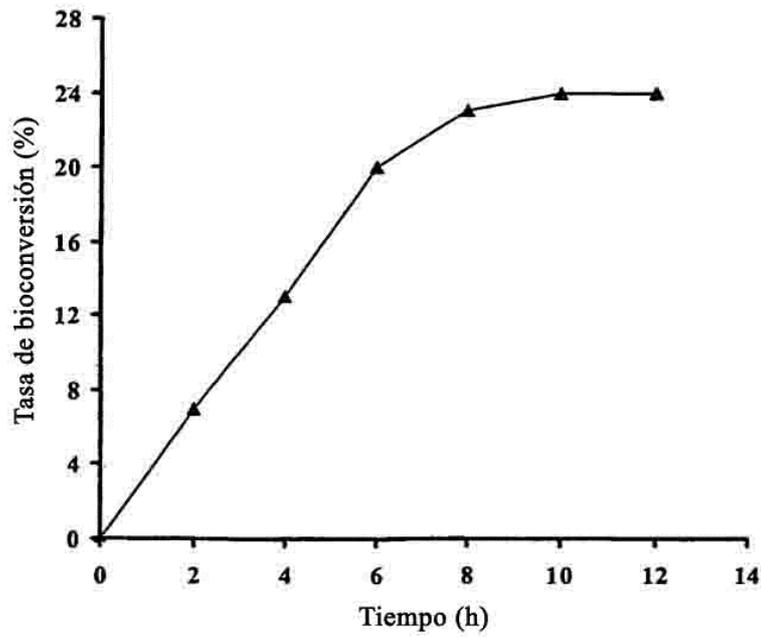


FIG.4

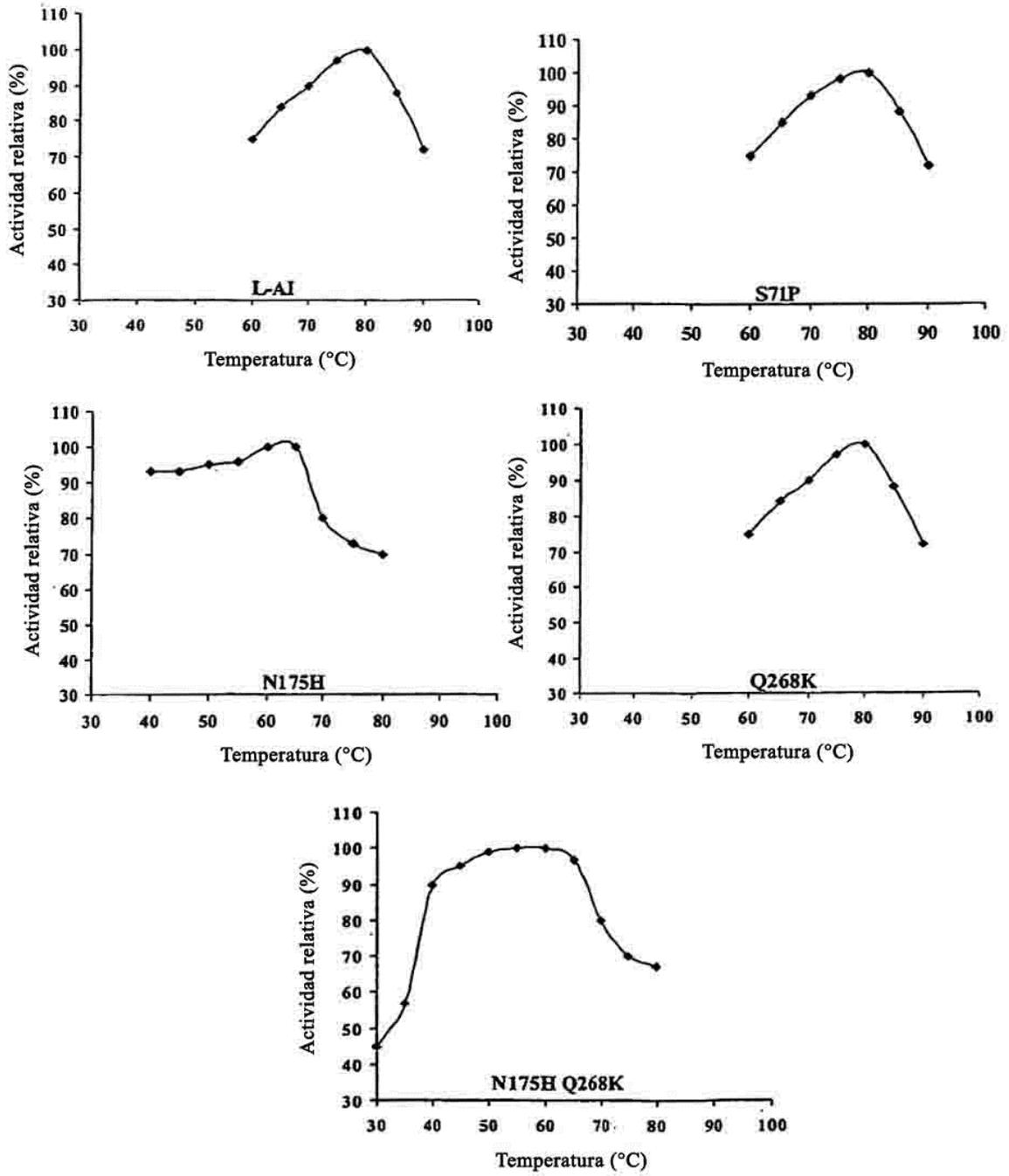


FIG.5

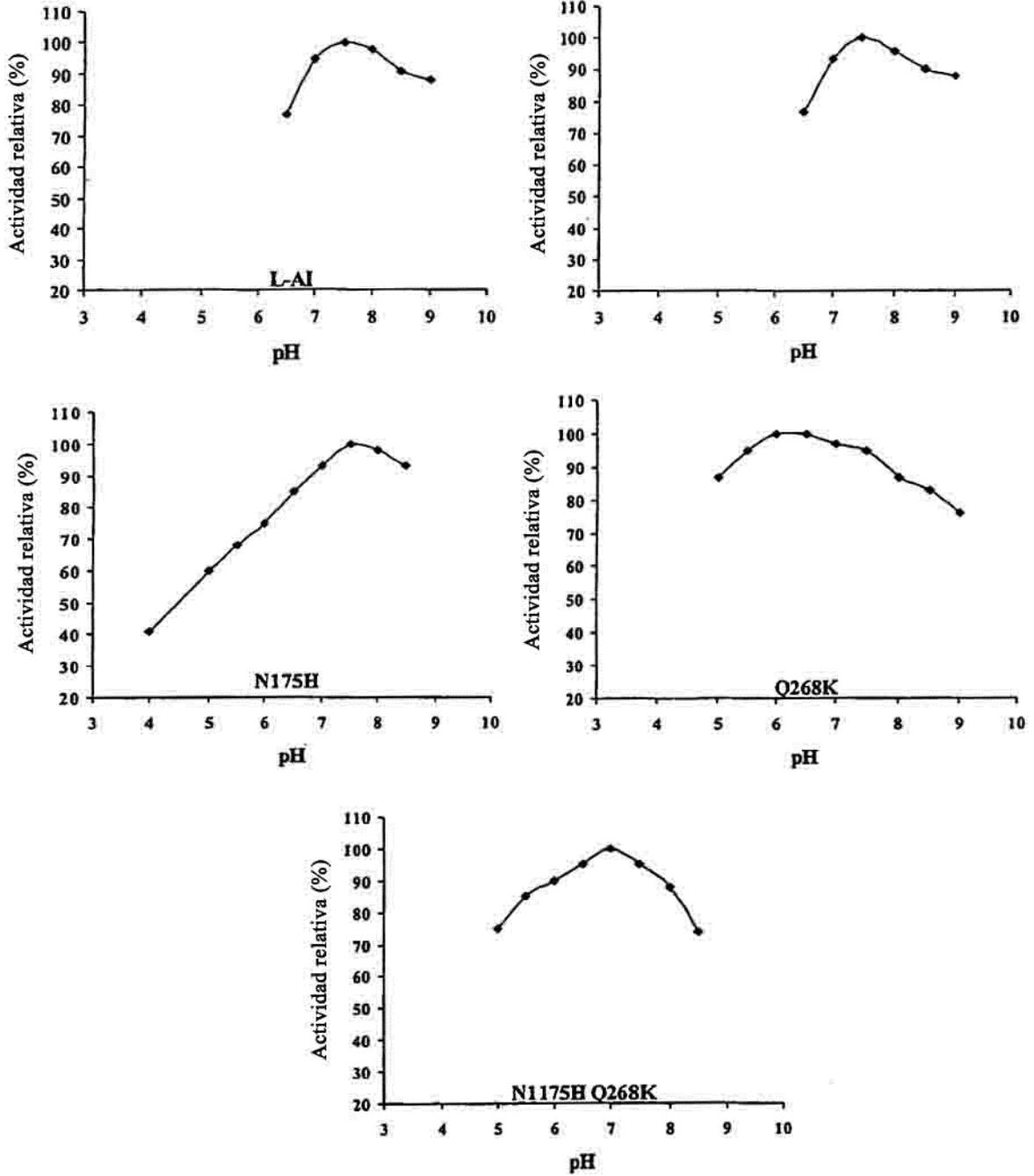


FIG.6

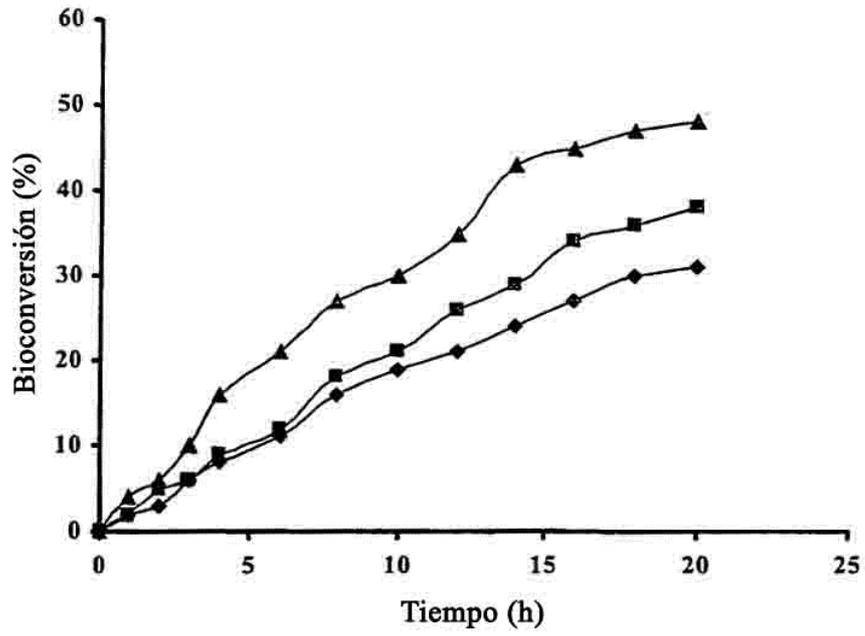


FIG.7

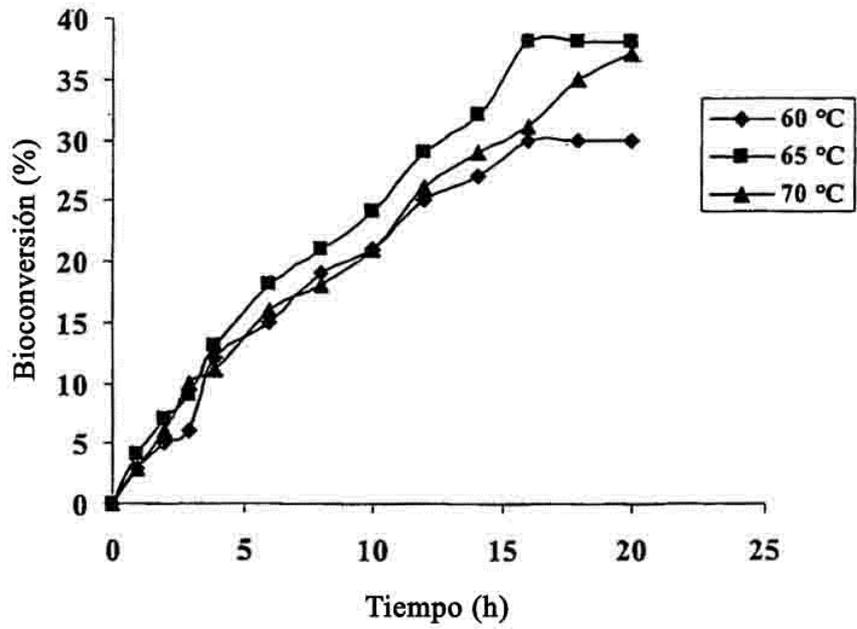


FIG.8