

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 508**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2012 PCT/JP2012/056340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO2012124668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2012 E 12758277 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2687598**

54 Título: **Método para determinar actividad de arilsulfatasa**

30 Prioridad:

14.03.2011 JP 2011055259

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

19.06.2017

73 Titular/es:

**GODO SHUSEI CO., LTD. (100.0%)
6-2-10, Ginza, Chuo-ku
Tokyo, 1048162, JP**

72 Inventor/es:

**SHIOTA, KAZUMA;
HORIGUCHI, HIROFUMI;
IYOTANI, AI;
YOSHIKAWA, JUN y
SATO, TOMOKO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 617 508 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

Método para determinar actividad de arilsulfatasa

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método muy sensible para determinar actividad de arilsulfatasa, una preparación de lactasa en la que se ha confirmado que la arilsulfatasa no contamina la preparación o existe en una pequeña cantidad si contamina la preparación por el método muy sensible de arilsulfatasa según la presente invención, un método para producir dicha preparación de lactasa, y un producto lácteo que se ha producido usando dicha preparación de lactasa.

Técnica anterior

10 Desde tiempos ancestrales, la leche de vaca se ha aplicado como un alimento nutritivo y útil a largo plazo. La leche de vaca comprende lactosa que es un azúcar. La lactosa se descompone por la lactasa en el intestino. Sin embargo, debido en parte a que la secreción en los seres humanos del volumen de lactasa en el intestino disminuye con el crecimiento, parte de los seres humanos desarrollan la denominada intolerancia a la lactosa con síntomas de dolor abdominal y diarrea si ingieren una gran cantidad de leche de vaca o su producto procesado (denominado de aquí en adelante en la presente memoria colectivamente "un producto lácteo"). Ésta ha sido una razón por la que una gran ingesta de este alimento nutritivo está prohibida.

En los últimos años, se proporcionan productos lácteos de los que se ha reducido o eliminado previamente la lactosa. Los seres humanos que padecen intolerancia a la lactosa también pueden ingerir dicho producto lácteo sin ningún problema.

20 La reducción o eliminación de la lactosa se lleva a cabo por varios métodos, y el método más común es uno en el que la lactosa se hidroliza mediante tratamiento de un producto lácteo con una preparación de lactasa.

Previamente, los productos lácteos que se habían obtenido mediante la descomposición de la lactosa con lactasa se distribuían comúnmente después de una etapa de esterilización. Sin embargo, recientemente, un medio es prevalente, medio en el que se añade una preparación de lactasa a leche de vaca estéril en condiciones asépticas y la lactosa se descompone durante la distribución. Se piensa que mediante este medio la cantidad de la preparación de lactasa que se va a usar puede reducirse y que este medio contribuye a una reducción del coste.

30 Por otra parte, mediante el empleo de medios en los que una preparación de lactasa se añade a leche de vaca estéril en condiciones asépticas, ha surgido un nuevo problema. Es un problema, cuya causa es que las enzimas contaminantes (proteasa y arilsulfatasa) que están contenidas en una pequeña cantidad en la preparación de lactasa causan cambios en los constituyentes de la leche porque estas enzimas no se han inactivado. De hecho, se ha sabido que la proteasa causa cuajado o desarrollo de sabor amargo. Además, en la Bibliografía no de Patente 1, se reporta que la arilsulfatasa causa el desarrollo de sabor y olor inaceptable e indeseable.

La Bibliografía de Patente 1 describe una preparación de lactasa en la que la cantidad de arilsulfatasa contaminante se reduce y un método para producirla. Sin embargo, por el método para determinar la actividad de arilsulfatasa que se describe en la Bibliografía de Patente 1, la actividad arilsulfatasa no puede determinarse en un intervalo de cantidades traza de 8 unidades o menos (actividad arilsulfatasa por 1 NLU de una sustancia que tiene actividad lactasa, de aquí en adelante en la presente memoria debe aplicarse lo mismo), y sólo se describe como un límite de detección o menos. Además, la Tabla 1 de la Bibliografía de Patente 1 describe que, si la actividad de la arilsulfatasa contaminante es 19 unidades o menos, no ocurrirá el sabor anormal en el producto lácteo. Sin embargo, este criterio se basa en el resultado de un examen a corto plazo en el que la duración de la reacción es 2 días. Se infiere que la causa, por la que se desarrolla el sabor anormal en los productos lácteos, es un cambio químico de un constituyente de la leche por una enzima, arilsulfatasa, y se asume una duración de la reacción más larga de 2 a 3 meses en la leche estable en almacenamiento a temperaturas ordinarias (leche UHT) como su uso. Si es así, no puede decirse que una preparación de lactasa que tiene una actividad arilsulfatasa de 19 unidades o menos, que se ha determinado por el método según la Bibliografía de Patente 1, no desarrollará sabor anormal en los productos lácteos. Continúan sin decir que es necesario controlar más rigurosamente la cantidad de arilsulfatasa contaminante y que es necesario emplear un método más sensible para determinar la actividad de arilsulfatasa para controlar la cantidad de arilsulfatasa contaminante.

50 Para eliminar la arilsulfatasa que contamina una preparación enzimática para que sea la cantidad mínima, debe llevarse a cabo la purificación combinando métodos generales de purificación. Alternativamente, debemos seleccionar un microorganismo que pueda producir una enzima pretendida, del que se ha delecionado la producibilidad de arilsulfatasa, y cultivar el microorganismo. También, se puede usar un microorganismo que se ha obtenido transformando un huésped que no produce intrínsecamente arilsulfatasa para que produzca una enzima pretendida.

55 La Bibliografía de Patente 1 incluye descripciones acerca de un proceso para obtener un microorganismo, del que se ha reducido la producibilidad de arilsulfatasa por tratamientos de mutación, y un microorganismo, del que se ha

5 deleciónado el gen de la arilsulfatasa por procedimientos de ingeniería genética. Sin embargo, aunque se describe el proceso para obtener un microorganismo, del que se ha reducido la producibilidad de arilsulfatasa por tratamientos de mutación, no hay ningún ejemplo en el que el microorganismo se ha obtenido realmente. Concretamente, sólo se muestra una posibilidad para esto. En otras palabras, no se explica si el microorganismo, del que se ha reducido la producibilidad de arilsulfatasa por tratamientos de mutación, puede producirse en una escala industrial según el proceso como se describe en la Bibliografía de Patente 1. Para disrumpir los genes de arilsulfatasa por mutación en una cepa diploide de levadura que es útil para producir una preparación de lactasa en una escala industrial, es necesario obtener un mutante doble. Se ha pensado que la obtención de dicho mutante doble es difícil en la práctica.

10 Acerca de la deleción del gen de la arilsulfatasa por procedimientos de ingeniería genética, sólo se describe un ejemplo de la cepa CBS2359 que es monploide en la Bibliografía de Patente 1. En otras palabras, por el proceso como se describe en la Bibliografía de Patente 1, es difícil disrumpir efectivamente los genes en una cepa diploide de levadura que es útil para producir una preparación de lactasa, y así no puede prepararse una cepa que no produce arilsulfatasa y que es una cepa diploide de levadura.

15 Acerca de la actividad lactasa de las preparaciones de lactasa que se describen en los ejemplos de la Bibliografía de Patente 1, es aproximadamente 5.000 a 5.500 NLU/g para Maxilact (marca comercial registrada) LG5000 (producido por DSM) y aproximadamente 5.000 a 5.500 NLU/g para GODO YNL2 (producido por Godo Shusei Co., Ltd.). Además, la actividad lactasa de la preparación de lactasa no está clara, de la que la preparación se ha producido a partir de lactasa que se ha producido por un microorganismo, del que la producibilidad de arilsulfatasa se ha reducido por los tratamientos de mutación que se describen en los ejemplos de la Bibliografía de Patente 1. Sin embargo, si la cantidad de la preparación de lactasa que se añade a un producto lácteo se incrementa para obtener una actividad lactasa suficiente, por norma, se incrementará la cantidad absoluta de arilsulfatasa que contamina la preparación de lactasa. Por lo tanto, el potencial de desarrollo de sabor anormal se aumentará en los productos lácteos tal como leche estable en almacenamiento a temperaturas ordinarias (leche UHT).

25 **Bibliografía de la técnica anterior**

Bibliografía de Patente

Bibliografía de Patente 1: Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública No. 2009-517061.

Bibliografía no de Patente

Bibliografía no de Patente 1: V. Lopez, R.C., J. Agric. Food Chem. (1993), 41, p. 446-454

30 **Resumen de la invención**

Problemas a resolver por la invención

Incluso si la cantidad de arilsulfatasa que contamina una preparación de lactasa es una cantidad pequeñísima, dependiendo de la duración de la acción, una condición de temperatura, o semejantes, puede desarrollarse un sabor y olor inaceptable e indeseable cuando la preparación de lactasa se usa añadiéndola a leche o un producto lácteo. Para no causar dicha desventaja, se desea una preparación de lactasa que tenga una actividad lactasa mayor, en dicha preparación la cantidad de arilsulfatasa contaminante se reduce para ser una cantidad mínima, y preferiblemente la arilsulfatasa se elimina completamente. Para este propósito, es necesario desarrollar un método para determinar la actividad de arilsulfatasa, método mediante el cual, puede confirmarse que la cantidad de la arilsulfatasa contaminante en la preparación de lactasa se reduce para ser una cantidad mínima.

40 **Medios para resolver el problema**

Los presentes inventores han estudiado extensamente para resolver el problema anterior y han desarrollado un método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso que tiene una sensibilidad mayor que la de un método convencional. Además, mediante el método para determinar la actividad de arilsulfatasa que tiene una sensibilidad mayor que la del método convencional, que es uno de fluorescencia, han determinado la actividad de arilsulfatasa que ha contaminado una preparación de lactasa en una región en la que se ha considerado convencionalmente que era igual a o menor que el límite de detección, y han especificado la cantidad contaminante de la arilsulfatasa, cantidad a la que no se desarrollará un sabor u olor indeseable en la leche o productos lácteos. Así, han conseguido la presente invención.

50 Concretamente, la presente invención se refiere a un método para determinar actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso caracterizado porque la arilsulfatasa se somete a reacción con un sustrato, del que se libera un fluoróforo o cromóforo, al experimentar una acción de la arilsulfatasa, en un sistema de reacción acuoso que tiene una alta fuerza iónica.

Los ejemplos preferibles de medios para la reacción en un sistema de reacción acuoso que tiene una alta fuerza iónica son unos en los que la enzima se somete a reacción con un sustrato en un sistema de reacción acuoso al que

se ha añadido una sal inorgánica, y/o, otro en el que la enzima se somete a reacción con un sustrato en un tampón que no desnaturaliza la proteína enzimática.

El intervalo preferible de la concentración de la sal inorgánica en el sistema de reacción acuoso es 10 a 1.000 mM y el intervalo más preferible de ésta es 50 a 500 mM, y el intervalo preferible de la concentración del tampón es 10 a 200 mM y el intervalo más preferible de ésta es 50 a 200 mM.

La sal inorgánica anterior es preferiblemente al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en cloruro de potasio, cloruro de sodio, y sulfato de amonio. También, el tampón anterior es preferiblemente un tampón fosfato.

El método anterior para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención es preferiblemente particularmente uno que comprende las etapas (1) a (10) siguientes:

(1) Un espécimen en el que se predice la existencia de la arilsulfatasa se diluye arbitrariamente con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que comprende cloruro de potasio 0,5 M para obtener una muestra.

(2) Se prepara una disolución acuosa que comprende sulfato potásico de 4-metilumbeliferona en una concentración de 2 mM,

(3) La muestra y la disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferona se mezclan entre sí a una relación de 1:1 (en volumen) y se hacen reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas.

(4) A la disolución reaccionada, se añade una disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N que tiene la misma cantidad (en volumen) que la de la disolución reaccionada para parar la reacción, obteniendo así una muestra para determinación.

(5) Se determina la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm.

(6) Se disuelve 4-metilumbeliferona en tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que comprende cloruro de potasio 0,5 M para obtener una disolución que tiene una concentración apropiada, se añade disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N de una manera similar a la de en la etapa (4), y se determina la intensidad de la fluorescencia en las mismas condiciones que aquellas en la etapa (5).

(7) A partir de la etapa (6), se prepara una curva de calibración.

(8) A partir de la intensidad de la fluorescencia que se determinó en la etapa (5) y la curva de calibración que se preparó en la etapa (7), se calcula la concentración de 4-metilumbeliferona de la muestra para determinación, y el valor calculado se divide por 3, obteniendo así la concentración de la 4-metilumbeliferona en el caso en el que el periodo de tiempo de la reacción es 1 hora. Además, a partir del volumen de la disolución reaccionada, se calcula la cantidad de 4-metilumbeliferona que se liberó por la reacción de 1 hora.

(9) Debido a que la cantidad de la 4-metilumbeliferona así calculada se basa en la cantidad del espécimen que estaba contenido en la muestra preparada en la etapa (1), la cantidad calculada se convierte en la de la 4-metilumbeliferona por 1 g del espécimen.

(10) Cuando la cantidad de la 4-metilumbeliferona que se liberó por 1 hora del periodo de tiempo de la reacción del sustrato y la enzima es 1 nmol, se define como 1 unidad (U), y la unidad se muestra como una cantidad unitaria por 1 g del espécimen (es decir, una preparación de enzima), concretamente, "unidad (U)/g".

En la etapa (10), el "sustrato" es sulfato potásico de 4-metilumbeliferona y la "enzima" es arilsulfatasa.

El método anterior para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención puede aplicarse para determinar la actividad de arilsulfatasa en una preparación de lactasa.

Además, la presente invención se refiere a una preparación de lactasa producida mediante el uso, como un material bruto, de células de levadura o microorgánicas cultivadas y/o fluido de cultivo de estas células, en el que las células de levadura o microorgánicas son aquellas de una cepa diploide de levadura que tiene un gen de lactasa, en el que la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, o un microorganismo recombinante genético en el que se ha transformado un gen de lactasa de levadura y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, caracterizado porque la preparación de lactasa tiene una actividad lactasa de 4.000 NLU/g o más según el método FCC IV y tiene una actividad arilsulfatasa de 0,1% o menos de la actividad lactasa como base, en el que la actividad arilsulfatasa (unidad: U/g) se ha determinado y calculado por el método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención que comprende las etapas (1) a (10) anteriores.

La preparación de lactasa anterior según la presente invención también puede prepararse sin una etapa para eliminar arilsulfatasa. Aquí, la "etapa para eliminar arilsulfatasa" no incluye dicha etapa de que la proteína arilsulfatasa se purifica con proteína lactasa como una enzima pretendida, tal como, por ejemplo, fraccionamiento con sulfato de amonio de una disolución acuosa que comprende una enzima pretendida, entre métodos de

fraccionamiento y purificación que se llevan a cabo en este campo técnico. La etapa es una mediante la que la proteína lactasa como la enzima pretendida se separa de la proteína arilsulfatasa.

En la presente invención anterior, "la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida" significa que la proteína arilsulfatasa no se produce o su cantidad de producción se reduce debido a que, por ejemplo, un gen de arilsulfatasa (gen estructural) se ha disrumpido, un gen de regulación de la expresión que funciona para que el gen de arilsulfatasa exprese la proteína arilsulfatasa se ha disrumpido, o no hay gen de arilsulfatasa y/o no hay gen de regulación de la expresión para la proteína arilsulfatasa. Es preferible que no haya expresión de la proteína arilsulfatasa, es decir, su cantidad de producción es cero. Sin embargo, es aceptable que la expresión de la proteína arilsulfatasa esté restringida de manera que la relación de la actividad arilsulfatasa (unidad: U/g) a la actividad lactasa (unidad: NLU/g) será 0,1% o menos, preferiblemente 0,02% o menos.

Además, aunque la preparación de lactasa según la presente invención tiene una actividad lactasa de 4.000 NLU/g o más, es preferiblemente 4.500 NLU/g o más, y más preferiblemente 5.000 NLU/g o más.

La cepa diploide de levadura que tiene un gen de lactasa en la que la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida puede ser un mutante que se ha obtenido tratando una cepa diploide de levadura para mutarla o puede ser otro mutante que se ha obtenido manipulando una cepa diploide de levadura para delecionar un gen de arilsulfatasa o un gen para regular la expresión de una proteína arilsulfatasa. Un mutante es preferible, del que la cepa parental es una cepa diploide de levadura que tiene una gran cantidad de producción de proteína lactasa.

La cepa diploide de levadura es preferiblemente una cepa diploide de *Kluyveromyces lactis* o *Kluyveromyces marxianus* que está relacionada de cerca con el *Kluyveromyces lactis*. Además, un microorganismo recombinante genético, en el que un gen de lactasa de levadura se ha transformado y la expresión de proteína arilsulfatasa está restringida, es preferiblemente un microorganismo recombinante genético, en el que se ha transformado un gen de lactasa de *Kluyveromyces lactis* o *Kluyveromyces marxianus*.

La presente invención también se refiere a un método para producir una preparación de lactasa caracterizado por el cultivo de una cepa diploide de levadura que tiene un gen de lactasa, en el que la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, o un microorganismo recombinante genético en el que un gen de lactasa de levadura se ha transformado y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida; recogida de las células de levadura o microorgánicas sin destruir sus paredes celulares, recogida del fluido de cultivo con las células de levadura o microorgánicas después de la destrucción de sus paredes celulares, o recogida del fluido de cultivo sin destruir las paredes celulares; y preparación de una preparación de lactasa que tiene una actividad lactasa de 4.000 NLU/g o más según el método FCC IV y una actividad arilsulfatasa de 0,1% o menos de la actividad lactasa como la base, en el que la actividad arilsulfatasa (unidad: U/g) se ha determinado y calculado por el método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención que comprende las etapas (1) a (10) anteriores, usando, como un material bruto, las células de levadura o microorgánicas recogidas y/o el fluido de cultivo recogido sin una etapa para eliminar la arilsulfatasa. El caso en el que el fluido de cultivo se recoge sin destruir las paredes celulares es un caso tal que el microorganismo recombinante genético secreta lactasa.

Las etapas para preparar la preparación de lactasa pueden comprender etapas de purificación que se llevan a cabo en este campo técnico, tales como concentración de la proteína lactasa. Sin embargo, en el método para producir una preparación de lactasa según la presente invención, no se lleva a cabo una etapa para eliminar arilsulfatasa. Debido a que se usa una cepa diploide de levadura o un microorganismo recombinante genético, en el que produce proteína lactasa que tiene alta actividad y la cantidad de producción de proteína arilsulfatasa contaminante es muy pequeña incluso si existe, una preparación de lactasa que tiene alta actividad lactasa puede obtenerse incluso si la relación de concentración de la lactasa producida no es grande, y debido a que la relación de concentración no es grande, la proteína arilsulfatasa contaminante no se vuelve altamente activa incluso si se ha concentrado.

Además, la presente invención se refiere a un producto lácteo que se ha producido usando la preparación de lactasa según la presente invención.

Efectos de la invención

En el método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención, la arilsulfatasa de mucha menor cantidad que la de anteriormente puede determinarse usando su actividad como un indicador. Debido a que se estableció un método muy sensible para determinar la actividad de arilsulfatasa según la presente invención, ha sido posible conocer exactamente la cantidad de arilsulfatasa en una preparación de lactasa usando su actividad como un indicador.

También, ha sido posible proporcionar una preparación de lactasa que tiene una alta actividad lactasa y que tiene una cantidad muy pequeña de arilsulfatasa contaminante o que no tiene arilsulfatasa usando, como un material bruto, células de levadura o microorgánicas cultivadas y/o fluido de cultivo de estas células, en el que las células de levadura o microorgánicas son aquellas de una cepa diploide de levadura que tiene un gen de lactasa en el que la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida o aquellas de un microorganismo recombinante genético en el que un gen de lactasa de levadura se ha transformado y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida. Debido a que la preparación de lactasa de la presente invención tiene una alta actividad lactasa, puede conseguirse

un efecto, efecto que es que el uso de la preparación puede reducirse, y así otro efecto también puede conseguirse, efecto que es que las cantidades de aditivos tales como estabilizadores o impurezas que se introducen en el objetivo, al que se añade la preparación, pueden reducirse incluso si la preparación contiene los aditivos o impurezas.

- 5 Cuando se usa una cepa diploide de levadura, hay tales ventajas que su propiedad es más difícil de alterar que la de una cepa monploide incluso después de la continuación de subcultivo, y que la cantidad de producción de una proteína por una cantidad unitaria de fluido de cultivo es generalmente mayor que la de una cepa monploide.

10 Cuando se usa la preparación de lactasa de la presente invención, puede conseguirse un efecto tal que el desarrollo de sabor y olor inaceptable e indeseable puede suprimirse en leche estable en almacenamiento a temperaturas ordinarias (leche UHT) o semejantes.

Según el método para producir una preparación de lactasa de la presente invención, se produce una preparación de lactasa que tiene una alta actividad lactasa sin una etapa para eliminar arilsulfatasa contaminante. Debido a que este método no comprende "la etapa para eliminar arilsulfatasa", su eficiencia de producción es alta y no hay reducción de actividad lactasa en etapas de purificación para eliminar arilsulfatasa.

15 **Descripción breve de los dibujos**

La Figura 1 es un gráfico que muestra un resultado de determinación de actividad arilsulfatasa por un método colorimétrico.

La Figura 2 es un gráfico que muestra un resultado de determinación de actividad arilsulfatasa por un método de fluorescencia.

- 20 La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra un método para construir un vector pdSuC1 para disrumpir un gen de arilsulfatasa.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un método para construir un vector pdSuCM6 para disrumpir un gen de arilsulfatasa.

- 25 La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un método para introducir dos vectores para disrumpir genes de arilsulfatasa.

La Figura 6 es una fotografía que muestra resultados de transferencias Southern de una cepa que comprende dos genes de arilsulfatasa, otra cepa en la que un gen de arilsulfatasa se ha disrumpido, y la otra cepa en la que dos genes de arilsulfatasa se han disrumpido.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

- 30 En primer lugar, se explicará un método para determinar la actividad de arilsulfatasa.

El método que se ha conocido convencionalmente como un método para determinar la actividad de arilsulfatasa es uno colorimétrico, en el que un compuesto que comprende un cromóforo tal como p-nitrofenol y un grupo sulfato que está acoplado al cromóforo se usa como un sustrato. En este método, la cantidad del cromóforo se determina por absorbancia, en el que el cromóforo se ha liberado debido a que el grupo sulfato ha dejado el sustrato por una reacción del sustrato con arilsulfatasa. Sin embargo, cuando la cantidad del cromóforo liberado tal como p-nitrofenol es baja, el cambio de la absorbancia es pequeño y así es difícil obtener un valor de determinación claro.

35 Como un método para determinar la actividad de arilsulfatasa, también se ha conocido un método de fluorescencia (Method in Enzymology, 11/21), en el que un compuesto que comprende un fluoróforo y un grupo sulfato que está acoplado al fluoróforo, por ejemplo, sulfato de 4-metilumbeliferona, se usa como un sustrato. Se dice que la sensibilidad de un método de fluorescencia es generalmente al menos cien veces la de uno colorimétrico.

40 Los presentes inventores han estudiado las condiciones para la determinación, en condiciones en las que puede conseguirse una mayor sensibilidad que la de un método colorimétrico o de fluorescencia convencional en un método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso. Han llegado a una versión de que la actividad arilsulfatasa puede determinarse con una gran sensibilidad mediante el incremento de la fuerza iónica en un sistema de reacción de una enzima con un sustrato. Así, han establecido el método para determinar la actividad de arilsulfatasa según la presente invención. En el pasado, se desconocía absolutamente que mediante el incremento de la fuerza iónica en un sistema de reacción acuoso cuando la arilsulfatasa se hace reaccionar con su sustrato, la reacción de la enzima se activa notablemente y como resultado se libera un cromóforo o fluoróforo en una cantidad mayor. Mediante la realización del método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención en un método de fluorescencia, se ha vuelto posible conocer exactamente la cantidad de arilsulfatasa contaminante en una preparación de lactasa. Como resultado, se ha vuelto posible proporcionar una preparación de lactasa, de la que la cantidad de arilsulfatasa es cero o una muy, muy pequeña.

El método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención se caracteriza porque cuando la arilsulfatasa se hace reaccionar con su sustrato (con la condición de que el sustrato libere fluoróforo o cromóforo al experimentar una acción de la arilsulfatasa), se incrementa la fuerza iónica del sistema de reacción. Los medios específicos para incrementar la fuerza iónica en el sistema de reacción incluyen uno en el que una sal inorgánica coexiste y otro en la que la reacción enzimática se realiza en un sistema de tampón.

Los ejemplos de sales inorgánicas que deben añadirse al sistema de reacción incluyen cloruro de potasio, cloruro de sodio, sulfato de amonio, y semejantes. La concentración de dicha sal inorgánica es, por ejemplo, 10 a 1.000 mM y preferiblemente 50 a 500 mM en el sistema de reacción. Los ejemplos de tampón incluyen tampones fosfato tales como tampones de ácido fosfórico-fosfato de potasio (en los que el concepto de fosfato de potasio incluye dihidroxifosfato de potasio, hidroxifosfato de dipotasio, y fosfato de tripotasio), tampones ácido fosfórico-fosfato de sodio (en los que el concepto de fosfato de sodio incluye dihidroxifosfato de sodio, hidroxifosfato de disodio, y fosfato de trisodio), y disolución salina tamponada con fosfato, que no desnaturalizan la proteína enzimática. La concentración del tampón en el sistema de reacción es, por ejemplo, 10 a 200 mM, y preferiblemente 50 a 200 mM. Para coexistir la sal inorgánica en el sistema de reacción, por ejemplo, puede añadirse una sal inorgánica a una disolución acuosa de un espécimen en el que se predice la existencia de arilsulfatasa (por ejemplo, uno obtenido disolviendo el espécimen en agua o un tampón), o puede añadirse una sal inorgánica a una disolución acuosa de un sustrato.

Un ejemplo típico el método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la presente invención es como sigue:

(1) Un espécimen en el que se predice la existencia de la arilsulfatasa se diluye arbitrariamente con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que comprende cloruro de potasio 0,5 M para obtener una muestra.

(2) Se prepara una disolución acuosa que comprende sulfato potásico de 4-metilumbeliferona en una concentración de 2 mM,

(3) La muestra y la disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferona se mezclan entre sí a una relación de 1:1 (en volumen) y se hacen reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas.

(4) A la disolución reaccionada, se añade una disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N que tiene la misma cantidad (en volumen) que la de la disolución reaccionada para parar la reacción, obteniendo así una muestra para determinación.

(5) Se determina la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm.

(6) Se disuelve 4-metilumbeliferona en tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que comprende cloruro de potasio 0,5 M para obtener una disolución que tiene una concentración apropiada, se añade disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N de una manera similar a la de en la etapa (4), y se determina la intensidad de la fluorescencia en las mismas condiciones que aquellas en la etapa (5).

(7) A partir de la etapa (6), se prepara una curva de calibración.

(8) A partir de la intensidad de la fluorescencia que se determinó en la etapa (5) y la curva de calibración que se preparó en la etapa (7), se calcula la concentración de 4-metilumbeliferona de la muestra para determinación, y el valor calculado se divide por 3, obteniendo así la concentración de la 4-metilumbeliferona en el caso en el que el periodo de tiempo de la reacción es 1 hora. Además, a partir del volumen de la disolución reaccionada, se calcula la cantidad de 4-metilumbeliferona que se liberó por la reacción de 1 hora.

(9) Debido a que la cantidad de la 4-metilumbeliferona así calculada se basa en la cantidad del espécimen que estaba contenido en la muestra preparada en la etapa (1), la cantidad calculada se convierte en la de la 4-metilumbeliferona por 1 g del espécimen.

(10) Cuando la cantidad de la 4-metilumbeliferona que se liberó por 1 hora del periodo de tiempo de la reacción del sustrato y la enzima es 1 nmol, se define como 1 unidad (U), y la unidad se muestra como una cantidad unitaria por 1 g del espécimen (es decir, una preparación de enzima), concretamente, "unidad (U)/g".

La preparación de lactasa según la presente invención tiene una actividad lactasa de 4.000 NLU/g o más (preferiblemente 4.500 NLU/g o más, aún más preferiblemente 5.000 NLU/g o más) según el método FCC IV (Food Chemicals Codex Cuarta Edición, efectivo el 1 de julio, 1996, Committee on Food Chemicals Codex p. 801-802), y una actividad arilsulfatasa de 0,1% o menos (preferiblemente 0,02% o menos) de la actividad lactasa (unidad: NLU/g) del método FCC IV como base, en el que la actividad arilsulfatasa se determina y calcula por el método que se describe anteriormente como un ejemplo específico del método para determinar la actividad de arilsulfatasa según la presente invención.

En la producción de la preparación de lactasa según la presente invención, se usa una cepa diploide de levadura que tiene un gen de lactasa, en cuya cepa la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida y mediante cuya cepa se produce la proteína lactasa. Además, la cepa diploide de levadura que se usa en la presente invención es una que produce proteína lactasa con una alta actividad, que puede proporcionar una preparación de lactasa de 4.000 NLU/g o más tal como está o concentrándola. La cepa diploide de levadura es, por ejemplo, un mutante que puede obtenerse tratando un microorganismo para mutarlo. Dicho mutante puede obtenerse, por ejemplo, mediante un método en el que una cepa diploide de levadura que produce la proteína lactasa con alta actividad se expone a irradiación ultravioleta o a un mutágeno químico para llevar a cabo la mutación, disrumpiendo o delecionando así los genes de la arilsulfatasa o los genes que regulan la expresión de la proteína arilsulfatasa aproximadamente ambos genes del diploide, o un método en el que los genes de la arilsulfatasa o los genes que regulan la expresión de la proteína arilsulfatasa se delecionan por procedimientos de ingeniería genética aproximadamente ambos genes del diploide. Para saber si puede obtenerse un mutante deseado, debe determinarse la actividad arilsulfatasa de un fluido de cultivo en el que se ha cultivado la levadura mutada por el método (método de fluorescencia) para determinar la actividad de arilsulfatasa según la presente invención.

La inducción de mutación por ultravioleta se lleva a cabo, por ejemplo, irradiando ultravioleta a una suspensión de una levadura diploide. La mutagénesis química se lleva a cabo, por ejemplo, añadiendo un mutágeno químico a una suspensión de una levadura diploide. Los ejemplos del mutágeno químico incluyen 5-bromouracilo, 2-aminopurina, ácido nitroso, hiroxilamina, acriflavina, compuestos de metanosulfonato, nitrosoguanidina y semejantes.

Para delecionar los genes de arilsulfatasa o los genes que regulan la expresión de una proteína arilsulfatasa por procedimientos de ingeniería genética, deben aplicarse procedimientos de ingeniería genética comunes, por ejemplo, la obtención de un fragmento génico que tiene una secuencia que es homóloga a la secuencia del gen que se pretende delecionar, subclonación del fragmento en un vector para construir un nuevo vector para disrumplir el gen que se pretende delecionar, y transformación de una cepa diploide de levadura usando el nuevo vector.

En la producción de la preparación de lactasa según la presente invención, también puede usarse un microorganismo recombinante genético que produce proteína lactasa con alta actividad, en el que un gen de lactasa de levadura se ha transformado de manera que la proteína lactasa se expresa y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida. Como se ha descrito anteriormente, la "expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida" significa que la proteína arilsulfatasa no se produce o su cantidad de producción está reducida, debido, por ejemplo, a que los genes relacionados con la producción de la proteína arilsulfatasa están restringidos, específicamente debido a que no hay gen de arilsulfatasa y/o no hay gen que regula la expresión de la proteína arilsulfatasa, o, debido a que un gen de arilsulfatasa (gen estructural) se ha disrumplido o un gen que regula la expresión que estimula el gen de la arilsulfatasa para expresar proteína arilsulfatasa se ha disrumplido.

El microorganismo recombinante genético en el que se ha transformado un gen de lactasa de levadura y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida puede producirse por un método conocido. Por ejemplo, en un plásmido que es tolerante a la medicina A, se inserta un gen de lactasa, con un gen para regular la expresión del gen de lactasa si es necesario. Mediante el uso del plásmido para expresar lactasa así preparado, se transforma un microorganismo como un huésped. El microorganismo que se ha transformado se cultiva en un medio que comprende la medicina A, y se seleccionan las colonias que aparecen.

Como el huésped para obtener el microorganismo recombinante genético en el que se ha transformado el gen de lactasa de levadura y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, puede usarse *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y semejantes.

Como el huésped para obtener el microorganismo recombinante genético en el que se ha transformado el gen de lactasa de levadura y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, es preferible usar un huésped que intrínsecamente no tiene gen de arilsulfatasa ni un gen para regular la expresión de la proteína arilsulfatasa, u otro huésped en el que se ha disrumplido o delecionado el gen de arilsulfatasa o un gen para regular la expresión de la proteína arilsulfatasa.

La lactasa para la preparación de lactasa se produce cultivando una cepa diploide de levadura que tiene un gen de lactasa en la que la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida o un microorganismo recombinante genético en el que se ha transformado un gen de lactasa de levadura y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, en el que la cepa diploide de levadura y el microorganismo producen proteína lactasa que tiene una alta actividad; recogiendo las células de levadura o microorgánicas sin destruir sus paredes celulares, recoger el fluido de cultivo con células de levadura o microorgánicas después de la destrucción de sus paredes celulares, o recogiendo el fluido de cultivo sin destruir las paredes celulares; y usando como un material bruto las células de levadura o microorgánicas recogidas y/o el fluido de cultivo, sin ninguna etapa para eliminar la arilsulfatasa. El concepto de "fluido de cultivo" también incluye un sobrenadante de cultivo.

Para cultivar microorganismos tales como levaduras, puede usarse un incubador tal como un matraz, un frasco, y un tanque. Como las condiciones de cultivo, se seleccionan temperatura, pH, un número de agitación, y semejantes, que son adecuadas para la producción de una enzima por el microorganismo.

Después de la terminación del cultivo, se obtiene un fluido de cultivo que comprende lactasa disuelta generalmente destruyendo las paredes celulares. En el caso en el que el microorganismo que se ha cultivado secreta lactasa, puede no ser necesario destruir las paredes celulares. En el caso en el que no se usa un fluido de cultivo y sólo se han recogido células de levadura (o células microorgánicas), entonces las paredes celulares de las células de levadura (o células microorgánicas) se destruyen en agua destilada, y los constituyentes contenidos en las células se disuelven en el agua destilada para obtener una disolución acuosa que comprende las células de levadura (o células microorgánicas).

El fluido de cultivo o la disolución acuosa que comprende o que no comprende las células de levadura o microorgánicas se divide generalmente en sobrenadante y residuos por un método apropiado tal como centrifugación, filtración, o semejantes, que se lleva a cabo comúnmente en este campo técnico. El sobrenadante puede usarse como un fluido de enzima tal como está. O, después de incrementar su concentración usando una membrana de ultrafiltración o semejantes, el concentrado puede usarse como un fluido de enzima. El fluido de enzima puede pulverizarse por un método tal como secado por pulverización, secado por congelación, o semejantes. El fluido de enzima puede usarse en sí mismo como una preparación de lactasa.

La preparación de lactasa según la presente invención se produce usando una cepa diploide de levadura o un microorganismo que produce proteína lactasa que tiene una alta actividad y no produce proteína arilsulfatasa o la produce sólo en cantidad infinitesimal. Por lo tanto, generalmente no es necesario hacer, sólo para eliminar arilsulfatasa, una o más operaciones entre operaciones de purificación tales como adsorción, cromatografía, cristalización, y semejantes usando el fluido de cultivo o semejantes. El método para producir una preparación de lactasa según la presente invención no incluye ninguna etapa para eliminar arilsulfatasa. Como se ha descrito anteriormente, los métodos de purificación mediante los que la proteína lactasa no se separa de la proteína arilsulfatasa, tal como fraccionamiento con disolvente, fraccionamiento con sulfato de amonio, y semejantes, no están incluidos en la definición de "una etapa para eliminar arilsulfatasa".

Un constituyente esencial de la preparación de lactasa según la presente invención es la lactasa. En la preparación de lactasa, puede existir cualquier otro constituyente, siempre que la sustancia no inhiba la actividad de la lactasa y su cantidad sea una mediante la que no se inhibe la actividad de la lactasa; o siempre que la sustancia no interaccione de manera indeseable con un objetivo para el que se usa la preparación de lactasa. Los ejemplos de la sustancia que puede existir incluye aquellas que contribuyen a la estabilización de la lactasa, tal como sales metálicas, varios azúcares, ácido ascórbico, glicerol, y semejantes, excipientes que se usan para incrementar la usabilidad, tales como almidones y dextrina, y sales inorgánicas y semejantes que tienen acción tamponadora. El estado de la preparación de lactasa no está particularmente restringido. Su estado puede ser, por ejemplo, polvo, gránulo, disolución, o semejantes.

La presente invención también se refiere a productos lácteos que se han producido usando la preparación de lactasa según la presente invención. Los productos lácteos incluyen leches tales como leche estable en almacenamiento a temperaturas ordinarias (leche UHT), yogures, cremas frescas, cremas agrias, quesos, y semejantes. La preparación de lactasa se usa por un método y en la utilización (con la condición de que la cantidad se calcula sobre la base de su actividad lactasa) que son comunes en este campo técnico.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se explicará específicamente mediante referencia a Ejemplos.

Ejemplo 1 Desarrollo de un método para determinar la actividad arilsulfatasa (Parte 1)

Se sometió GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) a una dilución de 5 veces con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía cloruro de potasio 0, 0,2, 0,5 ó 1,0 M. A 0,5 mL de cada disolución, se añadieron 0,5 mL de sulfato de p-nitrofenilo en tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas. La reacción se paró añadiendo a la disolución 1,5 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 1,5 N y la absorbancia se determinó a 410 nm. Los valores relativos se muestran en la Tabla 1, en la que se especifica el caso en el que no hay cloruro de potasio como 100%.

Tabla 1

Incremento del valor determinado de actividad arilsulfatasa por cloruro de potasio

Concentración de cloruro de potasio en el sistema de reacción (mM)	0	0,1	0,25	0,5
Valor relativo (%)	100	230	350	420

Como se muestra en la Tabla 1, los valores determinados de actividad arilsulfatasa se incrementaron por la adición de cloruro de potasio. En otras palabras, por la adición de cloruro de potasio, se pudo conseguir un ensayo con mayor sensibilidad.

Ejemplo 2 Desarrollo de un método para determinar la actividad arilsulfatasa (Parte 2)

5 (1) Se sometió GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) a una dilución de 100 veces con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía cloruro de sodio 0, 125, 250, 500, ó 1.000 mM. A 0,5 mL de cada disolución, se añadieron 0,5 mL de disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferona 2 mM y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas. La reacción se paró
10 añadiendo a la disolución 1,0 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N y la intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm. Los valores relativos se muestran en la Tabla 2, en la que se especifica el caso en el que no hay cloruro de sodio como 100%.

(2) La reacción y determinación de la fluorescencia se llevaron a cabo de la misma manera que la descrita en el (1) anteriormente, excepto que se usó tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 6,5) como el diluyente para la enzima en
15 lugar de tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

(3) La reacción y determinación de la fluorescencia se llevaron a cabo de la misma manera que la descrita en el (1) anteriormente, excepto que se añadió cloruro de potasio al diluyente para la enzima en lugar de cloruro de sodio. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

20 (4) La reacción y determinación de la fluorescencia se llevaron a cabo de la misma manera que la descrita en el (1) anteriormente, excepto que se usó tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 6,5) en lugar de tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) como el diluyente para la enzima, y que se añadió cloruro de potasio al diluyente para la enzima en lugar de cloruro de sodio. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Incremento del valor determinado de actividad arilsulfatasa por combinación de sal inorgánica y tampón

Tipo de tampón y concentración en el sistema de reacción	Concentración de sal inorgánica en el sistema de reacción (mM)	Valor relativo (%)				
		0	62,5	125	250	500
	Tipo de sal inorgánica					
Tampón fosfato de potasio 50 mM	Cloruro de sodio	100	230	310	440	600
Tampón fosfato de sodio 50 mM	Cloruro de sodio	100	200	310	410	550
Tampón fosfato de potasio 50 mM	Cloruro de potasio	100	230	330	460	640
Tampón fosfato de sodio 50 mM	Cloruro de potasio	100	220	340	470	600

25 Como se muestra en la Tabla 2, los valores determinados de actividad arilsulfatasa se incrementaron en una relación aproximadamente similar cuando se añadió cloruro de sodio o cloruro de potasio como una sal inorgánica, y la reacción y determinación se llevaron a cabo en tampón fosfato de potasio o fosfato de sodio.

Ejemplo 3 Desarrollo de un método para determinar la actividad arilsulfatasa (Parte 3)

30 (1) Se sometió GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) a una dilución de 100 veces con tampón fosfato de potasio 100 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, ó 1.000 mM (pH 6,5). A 0,5 mL de cada disolución, se añadieron 0,5 mL de disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferona 2 mM y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas. A la disolución, se añadió 1,0 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N (para tampones fosfato de potasio 100 mM, 125 mM, y 250 mM) o disolución
35 acuosa de hidrocloreuro de sodio 1,0 N (para tampones fosfato de potasio 500 mM y 1.000 mM) para parar la reacción, y la intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm. Los valores relativos se muestran en la Tabla 3, en la que se especifica el caso en el que se usó tampón fosfato de potasio 100 mM como 100%.

5 (2) La reacción se llevó a cabo de la misma manera que la descrita en el (1) anteriormente, excepto que la enzima se diluyó con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) y se añadió sulfato de amonio 0, 125, 250, 500, o 1.000 mM. Para el sistema al que se había añadido sulfato de amonio 1.000 mM, se añadió 1,0 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 1,0 N para parar la reacción, y para los otros sistemas, se añadió 1,0 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N para parar la reacción. La intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm. Los valores relativos se muestran en la Tabla 4, en la que el valor de actividad determinado en el sistema que no comprende sulfato de amonio añadido se especifica como 100%.

10 (3) La reacción y determinación de la fluorescencia se llevaron a cabo de la misma manera que la descrita en el (2) anteriormente, excepto que se añadió glucosa 0, 125, 250, 500, ó 1.000 mM al diluyente de la enzima en lugar de sulfato de amonio. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3

Incremento del valor determinado de actividad arilsulfatasa por tampón fosfato de potasio

Concentración de tampón fosfato de potasio en el sistema de reacción (mM)	50	62,5	125	250	500
Valor relativo (%)	100	140	190	160	170

15 Tabla 4

Incremento del valor determinado de actividad arilsulfatasa por combinación de aditivo y tampón

Tipo de tampón y su concentración en el sistema de reacción	Concentración de aditivo en el sistema de reacción (mM)	Valor relativo (%)				
		0	62,5	125	250	500
	Tipo de aditivo					
Tampón fosfato de potasio 50 mM	Sulfato de amonio	100	270	370	390	400
Tampón fosfato de potasio 50 mM	Glucosa	100	140	190	160	170

20 Como se muestra en la Tabla 3, aunque en el incremento en la concentración de tampón también contribuyó a elevar los valores determinados de actividad arilsulfatasa, el efecto fue pequeño. Además, como se muestra en la Tabla 4, la adición de sulfato de amonio incrementó los valores determinados de actividad arilsulfatasa, mientras la glucosa mostró un efecto menor para incrementar los valores determinados de actividad arilsulfatasa.

Ejemplo 4 Confirmación de la etapa en la que se produce el efecto de la adición de sal inorgánica.

Se confirmó que el efecto de la adición de una sal inorgánica se debe a una reacción enzimática estimulada o intensidad de la fluorescencia del fluoróforo aumentada.

25 Se sometió GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) a una dilución de 100 veces con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5). Además, se sometió separadamente a una dilución de 100 veces con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía cloruro de potasio 0,5 M. A 0,5 mL de cada disolución, se añadieron 0,5 mL de disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferona 2 mM y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 1 hora. A la disolución, se añadió 1,0 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N para parar la reacción. A 200 µL de cada disolución después de parar la reacción, se añadieron 200 µL de una disolución acuosa que contenía cloruro de potasio a una concentración de 0 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, ó 1.000 mM, y la intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm. Como un blanco, se usó una disolución, disolución que se había preparado añadiendo disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N a una disolución de enzima diluida para inactivar y después añadiendo disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferona.

35 Los valores relativos se muestran en la Tabla 5, en la que el caso en el que la preparación de lactasa que se había sometido a una dilución de 100 veces con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) se usó para la reacción y no

se añadió cloruro de potasio después de parar la reacción (se añadieron 200 µL de agua destilada con una concentración de cloruro de potasio 0 mM) se especifica como 100%.

Tabla 5

Confirmación de la etapa en la se muestra el efecto de la adición de sal inorgánica

Concentración de cloruro de potasio (mM) en disolución acuosa de cloruro de potasio que se añadió después de parar la reacción	Valor relativo (100%)				
	0	125	250	500	1.000
Condición durante la reacción					
En el caso en el que la reacción se llevó a cabo en tampón fosfato de potasio 50 mM (%)	100 (base)	100	100	100	100
En el caso en el que la reacción se llevó a cabo en tampón fosfato de potasio 50 mM + cloruro de potasio 250 mM (%)	520	520	520	510	490

5

Como se muestra en la Tabla 5, cuando se había añadido la sal inorgánica antes de empezar la reacción, es decir, cuando la reacción enzimática se llevó a cabo en presencia de la sal inorgánica, la intensidad de la fluorescencia se aumentó, mientras que la intensidad de la fluorescencia no se aumentó, cuando la sal inorgánica se añadió después de la terminación de la reacción enzimática. De acuerdo con esto, resulta claro que debido a que la sal inorgánica estimulaba la reacción enzimática para incrementar la cantidad absoluta del fluoróforo liberado, la intensidad de la fluorescencia aumentó.

10

Ejemplo 5 Determinación de la actividad arilsulfatasa por el método colorimétrico convencional

Se diluyó GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) con agua destilada para obtener una disolución al 1% (p/v). La disolución se diluyó con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía cloruro de potasio 0,5 M para obtener disoluciones al 0,8% (p/v), 0,6% (p/v), 0,4% (p/v), y 0,2% (p/v). A 0,5 mL de cada disolución, se añadieron 0,5 mL de tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía sulfato de p-nitrofenilo 20 mM y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas. La reacción se paró añadiendo a esta disolución 1,5 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 1,5 N, y la absorbancia se determinó a 410 nm.

15

Los resultados se muestran en la Figura 1. Por el método colorimétrico, no se detectó actividad arilsulfatasa para la disolución al 1% (p/v) de la preparación de enzima.

20

Ejemplo 6 Determinación de la actividad arilsulfatasa por el método de fluorescencia

Se diluyó GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía cloruro de potasio 0,5 M para obtener una disolución al 1% (p/v). Esta disolución al 1% se diluyó adicionalmente con el mismo tampón para obtener disoluciones al 0,8% (p/v), 0,6% (p/v), 0,4% (p/v), y 0,2% (p/v).

25

A 0,5 mL de cada disolución, se añadieron 0,5 mL de disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferilo 2 mM y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas. A esta disolución, se añadió 1,0 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N para parar la reacción, y la intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm.

30

Los resultados se muestran en la Figura 2. Por el método de fluorescencia, a diferencia del método colorimétrico, las disoluciones de la preparación de enzima que tienen su concentración de 1% (p/v) o menor también mostraron un buen comportamiento cuantitativo.

Ejemplo 7 Comparación de los métodos colorimétrico y de fluorescencia en la determinación de la actividad arilsulfatasa

35

Se estudió la diferencia entre las sensibilidades de los métodos colorimétrico y de fluorescencia en la determinación de la actividad arilsulfatasa. En primer lugar, se preparó lactasa purificada para uso en este experimento.

Preparación de lactasa purificada

5 A 50 kg de GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.), se añadió agua para desalar usando una membrana de ultrafiltración (membrana ACP, producida por Asahi Kasei Corp.) hasta que la conductividad fue 3mSv o menor. La cantidad total se ajustó a 125 L mediante la adición de agua. Después, se adsorbió en una resina de intercambio iónico (DEAE TOYOPEARL 650M, 40cmφ, 50 L, producida por Tosoh Corp.) pre-equilibrada con tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 7). La resina se lavó con 40 L de tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 7) que contenía cloruro de sodio 50 mM, y después la lactasa se eluyó con 200 L de tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 7) que contenía cloruro de sodio 100 mM. Después de la elución, el eluato se dividió en fracciones de 20 L. Se determinaron la actividad lactasa (por el método FCC IV; Food Chemicals Codex 4ª Edición, efectiva el 1 de julio, 1996, Committee on Food Chemicals Codex, p. 801-802) y la actividad arilsulfatasa (por el método de fluorescencia; se describirá más adelante con detalle) de cada fracción, y las fracciones con arilsulfatasa reducida se recogieron, se mezclaron, y se concentraron usando una membrana de ultrafiltración (membrana ACP, producida por Asahi Kasei Corp.) para obtener una disolución de lactasa concentrada. A esta disolución concentrada, se añadió glicerol para que fuera 50% (p/v). Así, se obtuvo una preparación de lactasa purificada.

10 Se determinó la actividad arilsulfatasa de GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) y de la preparación de lactasa purificada preparada como se ha descrito anteriormente, ambas de las cuales tenían actividad lactasa por el método FCC IV de 5.000 a 5.500 NLU/g (el método de fluorescencia; se describirá más adelante con detalle). Se determinó que la actividad arilsulfatasa de la preparación de lactasa purificada era 1/840 comparada con la de la pre-purificación (véase la Tabla 6 más adelante).

Preparación de preparaciones enzimáticas con varias relaciones de contaminación de arilsulfatasa

20 La preparación de lactasa purificada preparada como se ha descrito anteriormente y GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) se mezclaron apropiadamente para preparar las preparaciones de lactasa con varias relaciones de contaminación de arilsulfatasa, y se determinaron la actividad lactasa (por el método FCC IV) y la actividad arilsulfatasa (por los métodos colorimétrico y de fluorescencia).

Determinación de la actividad arilsulfatasa por el método colorimétrico

30 A 0,5 mL de preparación de lactasa, se añadieron 0,5 mL de tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía sulfato de p-nitrofenilo 20 mM y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas. A esta disolución, se añadieron 1,5 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 1,5 N para parar la reacción, y la absorbancia se determinó a 410 nm.

Separadamente, se prepararon disoluciones acuosas que contenían p-nitrofenol a una concentración de 0 a 0,5 mM. A 0,5 mL de cada disolución, se añadieron 0,5 mL de tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5). Además, se añadieron 1,5 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 1,5 N para obtener muestras para la determinación. La absorbancia a 410 nm se determinó para preparar una curva de calibración.

35 A partir de la curva de calibración, se determinó la concentración de p-nitrofenol contenida en 1 mL de la disolución de reacción, y se dividió por 3 (debido a que el tiempo de la reacción era 3 horas), para calcular la concentración de p-nitrofenol para el periodo de tiempo de reacción de 1 hora. Después, a partir de esta concentración, se calculó la concentración de p-nitrofenol contenida en 1 mL de la disolución de la reacción (unidad: nmol), y se multiplicó por 2 (para convertir el valor en por 1 g, debido a que la cantidad de preparación de lactasa usada era 0,5 g), para calcular la actividad arilsulfatasa. Una U corresponde a la actividad que produce 1 nmol de p-nitrofenol en 1 hora, y la actividad arilsulfatasa se representa por la unidad "U/g de preparación de enzima".

Determinación de la actividad arilsulfatasa por el método de fluorescencia

45 La preparación de lactasa se diluyó con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenía cloruro de potasio 0,5 M para obtener una disolución al 1% (p/v). A 0,5 mL de esta disolución al 1%, se añadieron 0,5 mL de disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferilo 2 mM y la disolución se dejó reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas. A la disolución, se añadió 1 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N para parar la reacción, y la intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm.

50 Separadamente, se prepararon tampones fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contenían cloruro de potasio 0,5 M y 4-metilumbeliferona a una concentración de 0 a 4 μM. A 1,0 mL de cada disolución, se añadió 1 mL de disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N para obtener muestras para la determinación. La intensidad de la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm para preparar una curva de calibración.

55 A partir de la curva de calibración, se determinó la concentración de 4-metilumbeliferona contenida en 1 mL de la disolución de reacción, y se dividió por 3 (debido a que el periodo de tiempo de la reacción era 3 horas). Después, a partir del volumen de la disolución de la reacción, se calculó la cantidad absoluta de 4-metilumbeliferona producida

durante la reacción. La cantidad se multiplicó además por 200 (para convertir el valor en por 1 g del espécimen (preparación de lactasa), debido a que la cantidad de preparación de lactasa usada fue 0,5x0,01=0,005 g), y de esta manera se calculó la actividad arilsulfatasa. Una U es una actividad tal que 1 nmol de 4-metilumbeliferona se produce en 1 hora, y la actividad arilsulfatasa se representa por la unidad "U/g de preparación de enzima".

5 Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 6. Por el método colorimétrico, la determinación no fue posible cuando el contenido de arilsulfatasa disminuyó, mientras por el método de fluorescencia fue posible determinar con exactitud hasta el área de concentración de aproximadamente 1/100 del límite de detección por el método colorimétrico.

Tabla 6

10 Actividad lactasa y actividad arilsulfatasa de preparaciones de lactasa que contienen arilsulfatasa en varias relaciones de contaminación

	Actividad lactasa (NLU/g)	Actividad arilsulfatasa (U/g)		Actividad arilsulfatasa de esta invención/actividad lactasa (%)
		Método colorimétrico convencional	Método de esta invención	
GODO-YNL2	5.400	39	84	1,56
Mezcla de GODO-YNL2 con lactasa purificada	(5.500)	8,7	20	0,36
	(5.400)	ND	15	0,28
	(5.300)	ND	1	0,02
Lactasa purificada	5.500	ND	0,1	0,002

ND: no detectado

15 Ejemplo 8 Comparación del método de fluorescencia y el método como se indica en WO07/060247 (Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2009-517061) en la determinación de la actividad arilsulfatasa, y examen organoléptico para sabor (Parte 1)

En WO07/060247, se describe que una preparación de lactasa contaminada con 19 unidades (unidades que se definen en WO07/060247) o menos de arilsulfatasa no produce sabor anormal cuando la preparación se añade para descomponer la lactosa después de la esterilización de la leche. Sin embargo, ésta es una observación basada en un examen que se llevó a cabo con el periodo de tiempo de reacción de lactasa limitado de 2 días. Por otra parte, cuando se añade realmente una preparación de lactasa a leche estable en almacenamiento a temperaturas ordinarias (leche UHT), se piensa que la reacción enzimática continuaría durante un plazo mayor de 1 mes o más. Por lo tanto, se prepararon preparaciones de lactasa que contenían arilsulfatasa a varias relaciones de contaminación y se confirmó su sabor después de días predeterminados desde la adición de las preparaciones a la leche.

Preparación de preparaciones de lactasa con varias relaciones de contaminación de arilsulfatasa

Se produjeron preparaciones de lactasa A a E que tenían varias relaciones de contaminación de arilsulfatasa mezclando apropiadamente la preparación de lactasa purificada preparada en el Ejemplo 7 y GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.) seleccionado que contenía 100 unidades (sobre la base de lo descrito en WO07/060247) de actividad arilsulfatasa.

La actividad arilsulfatasa de cada una de las preparaciones de lactasa A a E así preparadas se determinó por el método descrito en WO07/060247 y el método de fluorescencia mostrado en el Ejemplo 7 anterior. Además, la actividad lactasa se determinó por el método FCC IV. Los resultados se muestran en la Tabla 7. En esta Tabla, la unidad como se describe en WO07/060247 significa $\Delta DO_{410} \times 10^6 / \text{hora/NLU}$.

35

Tabla 7

Actividad arilsulfatasa en preparaciones de lactasa que contienen arilsulfatasa en varias relaciones de contaminación

Nombre de la preparación de lactasa y actividad lactasa (NLU/g)	Actividad arilsulfatasa (unidad) que se determinó por el método descrito en WO07/060247 (Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2009-517061)	Actividad arilsulfatasa (U/g) que se determinó por el método de la presente invención	Actividad arilsulfatasa de esta invención/Actividad lactasa (%)
A (5.500)	ND	0,1	0,002
B (5.500)	ND	1,0	0,02
C (5.500)	8	27	0,5
D (5.500)	18	59	1,1
E (5.500)	100	320	5,8

5 ND: no detectado

Examen organoléptico de sabor

10 En referencia al Ejemplo 4 de WO07/060247, cada una de las preparaciones de lactasa A a E se añadió a una leche de vaca disponible comercialmente (una esterilizada con calor; condiciones estériles: 130 grados Celsius, 2 segundos) de manera que el contenido en lactasa se convertiría en 20.000 NLU/L de leche, y se mantuvo a 30 grados Celsius. Después de 2 días, 1 mes, y 3 meses de almacenamiento, se llevó a cabo un examen organoléptico para la leche de vaca a la que no se había añadido preparación de lactasa y las leches a las que se habían añadido preparaciones de lactasa.

15 El examen organoléptico se llevó a cabo como un estudio ciego. Once a trece panelistas olieron y mantuvieron en la boca la leche después del almacenamiento durante un determinado periodo de tiempo para juzgar la presencia o ausencia de sabor anormal. La evaluación se llevó a cabo puntuando 0 puntos (-) para ausencia de sabor anormal, 1 punto (+) que significaba que el panelista era consciente de sabor anormal, ó 2 puntos (++) que significaba que el panelista era fuertemente consciente de sabor anormal. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8

20 Resultados del examen organoléptico de sabor (sabor anormal) de leches de vaca que se trataron con preparaciones de lactasa que contenían arilsulfatasa en varias relaciones de contaminación

Preparaciones de lactasa	Periodo de tiempo de reacción		
	2 días	1 mes	3 meses
No añadida	-	-	-
A	-	-	-
B	-	-	-
C	-	++	++
D	-	++	++
E	+	++	++

++: fuertemente consciente

+: consciente

-: no consciente

Después de 2 días del periodo de tiempo de reacción por la preparación de lactasa (es decir, periodo de tiempo de almacenamiento de la leche de vaca), sólo la preparación E presentó un sabor anormal aparente. Esto coincidió con la descripción en WO07/060247. Sin embargo, cuando el periodo de tiempo de reacción fue 1 mes o más, las preparaciones C y D también presentaron un sabor anormal notorio. Esto indica que el sabor inusual y sabor anormal no pueden controlarse suficientemente, incluso si la actividad arilsulfatasa es 8 unidades, que es el límite de detección en la unidad descrita en WO07/060247, considerando que las preparaciones de lactasa se usan, por ejemplo, en leche estable en almacenamiento a temperaturas ordinarias (leche UHT).

Por otra parte, las preparaciones A y B no presentaron un sabor anormal notorio para el periodo de tiempo de reacción de 1 y 3 meses. Considerando el uso de la preparación de lactasa en leche estable en almacenamiento a temperaturas ordinarias (leche UHT), es necesario asumir un periodo de tiempo de reacción de 1 mes o más. Por lo tanto, para dicha utilización, resulta claro que es preferible usar la preparación de lactasa A o B (es decir, una que tenga una relación de la actividad arilsulfatasa por el método de la presente invención a la actividad lactasa por el método FCC IV de 0,02% o menos) y que es más preferible usar la preparación de lactasa A. Además, resultó claro que es necesario determinar el valor de la actividad arilsulfatasa que es comparable con el de la preparación de lactasa A o B por el método de fluorescencia como se describe en esta descripción o por un método de análisis que tenga una sensibilidad similar o mayor que el método de fluorescencia anterior.

Ejemplo 9 Obtención de un mutante que tiene una producibilidad reducida de arilsulfatasa

El contenido de un asa de siembra de *Kluyveromyces lactis* G14-427, que era una cepa diploide, se inoculó en 10 ml de medio YPD (que contenía 1% de extracto de levadura, 1% de glucosa, y 2% de peptona). La suspensión de células obtenida se almacenó a 30 grados Celsius para cultivar las células. Después de llegar a una fase logarítmica, la suspensión se centrifugó y las células se recogieron. Las células recogidas se dispersaron en agua estéril de manera que la absorbancia de la suspensión obtenida se convirtió en 0,5 a 600 nm. Mediante el uso de una lámpara UV, se irradió ultravioleta a la suspensión durante 15 segundos. Las células se recogieron por centrifugación, y las células recogidas se dispersaron en medio YPD mediante mezclado. A partir del medio YPD que comprendía las células, se tomó una dosis óptima del medio YPD y se aplicó en una placa de agar YPD. El cultivo estático de la placa se llevó a cabo a 37 grados Celsius durante 7 días. A partir de una colonia que había crecido, se raspó una pequeña cantidad de células, y las células raspadas se mezclaron con 1 ml de disolución que comprendía Zimoliasa (producida por Seikagaku Bio-business Corporation) en una cantidad de 1 mg/mL. La reacción se llevó a cabo a 30 grados Celsius durante 2 horas para destruir las paredes celulares. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación y se recogió el sobrenadante.

Se determinaron la actividad lactasa (el método FCC IV) y la actividad arilsulfatasa (por el método de fluorescencia descrito en el Ejemplo 7) del sobrenadante. Se calculó la relación de la actividad arilsulfatasa a la actividad lactasa y se seleccionaron las cepas que presentaron valores pequeños.

Las cepas seleccionadas se sometieron repetidamente a los tratamientos anteriores para mutación y selección. Como resultado, se pudo obtener un mutante (cepa SM1182), cepa en la que un gen de arilsulfatasa entre dos genes de arilsulfatasa que habían existido en la cepa diploide, *Kluyveromyces lactis* G14-427, se convirtió en disfuncional. El criterio de que "un gen de arilsulfatasa entre dos genes de arilsulfatasa se convirtió en disfuncional" se basó en el hecho siguiente: el sobrenadante del cultivo de la cepa SM1182 presentó una actividad arilsulfatasa de aproximadamente la mitad de la del sobrenadante del cultivo de la cepa madre, cepa G14-427.

Además, el mutante obtenido (cepa SM1182) se usó como una cepa madre y se llevaron a cabo tratamientos para causar mutación. Como resultado, se obtuvo un mutante (cepa SF-81) en el que el otro gen de arilsulfatasa también se había convertido en disfuncional, concretamente, uno que tenía una actividad arilsulfatasa de cero.

Kluyveromyces lactis G14-427 como una cepa madre y dos mutantes que se habían obtenido por los métodos descritos anteriormente se cultivaron respectivamente por agitación en medio YPD (70 mL/matraz) a 26 grados Celsius durante 4 días.

Posteriormente, a cada medio de cultivo se añadió Zimoliasa (producida por Seikagaku Bio-business Corporation) para estar en una concentración de 2 mg/mL. La reacción se llevó a cabo a 30 grados Celsius durante 2 horas para destruir las paredes celulares. Los sobrenadantes se recogieron respectivamente por centrifugación, y se sometieron a determinaciones de la actividad lactasa por el método FCC IV y la actividad arilsulfatasa por el método descrito en el Ejemplo 7. La Tabla 9 muestra el resultado.

Tabla 9

Comparación de actividad arilsulfatasa de la cepa parental y la cepa mutante

	Actividad lactasa (NLU/g)	Actividad arilsulfatasa (U/g)
Cepa G14-427	16	6
Cepa SM182	16	3
Cepa SF-81	16	0

Ejemplo 10 Obtención de la cepa huésped

- 5 En 10 mL de medio YPD, se inoculó el contenido de un asa de siembra de *Kluyveromyces lactis*, cepa G14-427, que era una cepa diploide, y las células se crecieron hasta fase log a 30 grados Celsius. Las células se recogieron centrifugando el medio de cultivo. Las células recogidas se dispersaron en agua estéril de manera que la absorbancia de la suspensión obtenida se convirtió en 0,5 a 600 nm. Mediante el uso de una lámpara UV, se irradió ultravioleta a la suspensión celular durante 15 segundos. Las células se recogieron por centrifugación, y se mezclaron y dispersaron en medio YPD. Se tomó una cantidad apropiada de medio YPD que contenía las células y se extendió en una placa de agar YPD. El cultivo estático de la placa se llevó a cabo a 37 grados Celsius durante 4 días en condiciones estáticas. Las colonias que habían crecido se cultivaron en medio SD (0,67% base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 2% glucosa, 2% agar) después de su réplica en placa, y se seleccionaron aquellas que no habían sido capaces de crecer.
- 10
- 15 Estas cepas que no habían sido capaces de crecer en el medio SD anterior se extendieron en otro medio SD que contenía 20 mg/mL de L-metionina de la placa de agar YPD original, y aquellas que habían crecido se designaron como mutante que requiere L-metionina (cepa 7-19).

- 20 En 10 mL de medio YPD, se inoculó el contenido de un asa de siembra de la cepa 7-19, y las células se crecieron hasta fase log a 30 grados Celsius. Las células se recogieron centrifugando el medio de cultivo. Las células recogidas se dispersaron en agua estéril de manera que la absorbancia de la suspensión obtenida se convirtió en 0,5 a 600 nm. Mediante el uso de una lámpara UV, se irradió ultravioleta a la suspensión celular durante 15 segundos. Las células se recogieron por centrifugación, y se mezclaron y dispersaron en medio YPD. Se tomó una cantidad apropiada de medio YPD que contenía las células y se extendió en una placa de agar YPD. El cultivo estático de la placa se llevó a cabo a 37 grados Celsius durante 4 días. Las colonias que habían crecido se cultivaron en medio SD que contenía 20 mg/mL de L-metionina después de su réplica en placa, y se seleccionaron aquellas que no habían sido capaces de crecer.
- 25

- 30 Estas cepas que no habían sido capaces de crecer en el medio SD anterior que contenía L-metionina se extendieron en otro medio SD que contenía 20 mg/mL de L-histidina y 20 mg/mL de L-metionina de la placa de agar YPD original, y aquellas que habían crecido se designaron como mutante que requiere doble nutriente L-metionina y L-histidina (cepa 8-23). El crecimiento de los mutantes que requieren nutrientes se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Crecimiento de cepas mutantes en varios medios de cultivo

	Medio SD	Medio SD + L-Metionina	Medio SD + L-Metionina + L-Histidina
Cepa G14-427	+	+	+
Cepa 7-19	-	+	+
Cepa 8-23	-	-	+

- 35 +: crecieron -: no crecieron

Ejemplo 11 Obtención de una cepa con doble disrupción de gen que no produce arilsulfatasa

Obtención de la cepa huésped

Se confirmó que en la cepa 8-23 que era el mutante que requería doble nutriente L-histidina y L-metionina en el Ejemplo 10, los requerimientos de nutrientes se complementarían por el gen HIS4 y gen MET6, respectivamente, introducidos por el método del acetato de litio.

5 Obtención de ADN genómico

La cepa G14-427 de *Kluyveromyces lactis*, que era una cepa diploide, se cultivó en medio YPD. A partir del fluido de cultivo obtenido, se preparó ADN genómico usando Dr. GenTLE™ (de levadura) (producido por Takara Bio Inc.). La manipulación se llevó a cabo según las instrucciones en el manual de operación adjunto a Dr. GenTLE™ (de levadura).

10 Construcción del vector para disrumpir el gen de arilsulfatasa

Se diseñaron los cebadores SuC-F y SuC-R de manera que se obtendría un fragmento que contenía el marco de lectura abierto del gen de arilsulfatasa. Las secuencias de los cebadores usados incluyéndoles se muestran en la Tabla 11

Tabla 11

Cebador Usado	
Nombre del Cebador	Secuencia (5' → 3')
SuC-F	ATGACCAAACAGATGAACCTA
SuC-R	CCAGTCTCTTGGCGTCGTGA
BGLHIS4-F	GAAGATCTCAGACCTGAGGTAACGTTTC
HIS4-R	CTGGGTAACCTGTTCTGGTG
SuCd-M6F	ATCGATGTTGTTGAGCGGTA CTGACAACCAT- -TTGCCAGGTTTCATCAACACAGAGCCG
SuCd-M6R	ATCGATAACTCTACCGATATTTTGGTCTAATT- -CATCAACCACTGTTGGTGGAG

15 Se obtuvo un fragmento de ADN llevando a cabo PCR en las condiciones siguientes con el ADN genómico preparado con anterioridad como el molde usando los cebadores anteriores. Como la polimerasa, se usó Takara Ex Taq (marca comercial registrada; producida por Takara Bio Inc.) y la manipulación se llevó a cabo según las instrucciones adjuntas.

20 Condiciones de PCR

Estadio 1 (1 ciclo) 94 grados Celsius, 3 min.

Estadio 2 (30 ciclos) 94 grados Celsius, 1 min.

54 grados Celsius, 1 min.

72 grados Celsius, 3 min.

25 Estadio 3 (1 ciclo) 72 grados Celsius, 10 min.

Mantener a 4 grados Celsius

30 El fragmento obtenido se purificó por MagExtractor™-PCR y Gel Clean up- (producido por Toyobo Co., Ltd.), y se llevó a cabo una reacción de ligación del fragmento con el vector pGEM (marca comercial registrada)-T (producido por Promega). Para la reacción de ligación, se usó el kit de ligación de ADN <Mighty Mix> (producido por Takara Bio Inc.). Los métodos de uso fueron como se indica en los documentos adjuntos respectivos. Después, se transformaron células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* que se habían preparado según el método de Hanahan (Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166, 557 (1983)), y a partir del fluido de cultivo del transformante obtenido, se extrajo plásmido usando MagExtractor™-Plásmido. (producido por Toyobo Co., Ltd.). El método de uso fue como se indica en el documento adjunto. Como resultado, se obtuvo el plásmido pGSuC, en el que se había subclonado el fragmento pretendido.

35 Además, mediante la realización de PCR usando los cebadores BGLHIS4-F y HIS4-R con ADN genómico como el molde, se obtuvo un fragmento que contenía el gen HIS4. La PCR se llevó a cabo como el método descrito

anteriormente. Como se muestra en la Figura 3, el fragmento obtenido que contenía el gen HIS4 se trató con Bgl II y Eco RI y después se insertó en el sitio Bgl II-Eco RI de pGSuC. El plásmido así construido se designó como pdSuC1. Los varios métodos usados para la construcción fueron similares a los indicados anteriormente.

5 Para construir un vector para disrumpir el gen de arilsulfatasa con el gen MET6 como un marcador, se diseñaron los cebadores SuCd-M6F y SuCd-M6R teniendo cada uno 40 bases de secuencia homóloga del gen de arilsulfatasa añadidas al lado 5'. Las secuencias homólogas del gen de arilsulfatasa estaban cerca de los sitios de la enzima de restricción para Cla I, que existían dos localizaciones en el marco de lectura abierto. Como se muestra en la Figura 4, se obtuvo un fragmento que tenía secuencias homólogas a arilsulfatasa en ambos extremos del gen MET6 usando estos cebadores y ADN genómico como el molde. El fragmento obtenido se subclonó en vector pGEM (marca comercial registrada)-T (producido por Promega) para obtener pdSuCM6. Los varios métodos usados para la construcción fueron similares a los indicados anteriormente.

Transformación de la cepa mutante 8-23 que requiere doble nutriente L-metionina y L-histidina usando un vector para disrumpir el gen de arilsulfatasa

15 La Figura 5 representa un diagrama esquemático de construcción de un transformante. El plásmido pdSuC1 se linearizó por tratamiento con Nco I y Aat II, seguido de transformación de la cepa 8-23 con el plásmido linearizado por el método del acetato de litio. Así, se obtuvo una cepa transformante, SuCD, cepa que creció en medio SD con 20 µg/mL de metionina añadida.

20 Después, el plásmido pdSuCM6 se linearizó mediante tratamiento con ClaI, seguido de transformación de la cepa SuCD con el plásmido linearizado por el método del acetato de litio. Así, se obtuvo una cepa transformante, SuCDD5-2, cepa que creció en medio SD.

Transferencia Southern de los ADN de la cepa parental y cepas transformantes

25 Los transformantes obtenidos se cultivaron respectivamente en medio YPD, y se prepararon los ADN genómicos respectivamente a partir de los fluidos de cultivo usando Dr. GenTLE™ (de levadura) (producido por Takara Bio Inc.). Los ADN genómicos obtenidos se digirieron con Bam HI, seguido de análisis Southern. Como la sonda, se usó el fragmento Aat II-Eco RI del gen de arilsulfatasa. Para el marcaje y detección de ácido nucleico, se usó el sistema de marcaje directo y detección AlkPhos con CDP-Star (producido por GE Healthcare Bioscience Co., Ltd.), y el método de uso fue según el documento adjunto.

30 Los resultados de la transferencia Southern se muestran en la Figura 6. Los carriles 1, 2, y 3 representan la cepa parental G14-427, el transformante SuCDD5-2, y el transformante SuCD, respectivamente. En el carril 3, con la banda (12,1 kb) del fragmento que contiene el gen de arilsulfatasa y el gen HIS4, también se detectó una banda en la misma posición (7,8 kb) en el carril 1. Así, se confirmó que sólo uno de los genes de arilsulfatasa se había disrumpido. Por otra parte, en el carril 2, la banda de 7,8 kb se desplazó a 5,3 kb. Así, se confirmó que ambos genes de arilsulfatasa se habían disrumpido.

Detección de actividad arilsulfatasa en la cepa con doble disrupción de genes de arilsulfatasa

35 La cepa parental, cepa G14-427 de *Kluyveromyces lactis* (una cepa diploide) y la cepa SuCDD5-2 construida como se ha descrito anteriormente se inocularon respectivamente en medio YPD, y se incubaron a 30 grados Celsius, con agitación a 210 rpm durante 72 horas. A cada fluido de cultivo, se añadió Zimoliasa (producida por Seikagaku Biobusiness Corp.) para estar en una concentración de 2 mg/mL, y la reacción se llevó a cabo a 30 grados Celsius durante 2 horas para disrumpir las paredes celulares. Los sobrenadantes se recogieron respectivamente por centrifugación, y se determinaron la actividad lactasa y actividad arilsulfatasa por el método FCC IV y el método como se describe en el Ejemplo 7, respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

45 Se ha revelado que aunque en el fluido de cultivo de la cepa SuCDD5-2, está contenida lactasa, la arilsulfatasa no está contenida o está contenida en una cantidad muy pequeña, si lo está, de manera que no puede detectarse por el método de fluorescencia. Concretamente, se ha confirmado que aunque la cepa SuCDD5-2 mantiene la productividad de lactasa, la productividad de arilsulfatasa es cero o casi cero.

Tabla 12

Comparación entre la actividad arilsulfatasa de cepa que tiene dos genes de arilsulfatasa y otra cepa en la que ambos genes de arilsulfatasa se han disrumpido

Cepa que produce lactasa	Actividad lactasa (NLU/g)	Actividad arilsulfatasa (U/g)
Cepa G14-427	16	6
Cepa SucDD5-2	16	0

Ejemplo 12 Preparación de preparaciones enzimáticas con la cepa SF-81 y la cepa CBS2359

La cepa SF-81 (un mutante diploide con una productividad reducida de arilsulfatasa) obtenida en el Ejemplo 9 y la cepa CBS2359 (una cepa monoploide) se inocularon respectivamente en un medio para la producción de lactasa que contenía 7% de licor de maíz fermentado y 2% lactosa, y se incubó a 30 grados Celsius con agitación a 210 rpm durante 96 horas. Después, las células se recogieron respectivamente por centrifugación. Se añadió agua purificada estéril a las células y las paredes celulares de las células recogidas se disrumpieron con lechos de vidrio y ondas ultrasónicas. La mezcla que contenía células así obtenida, agua purificada, y semejantes, se centrifugó y se recogió el sobrenadante. La actividad lactasa del sobrenadante obtenido se determinó por el método de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 7. Como resultado, la actividad relativa de la cepa CBS2359 fue 2% comparada con la actividad lactasa de la cepa SF-81 que se especificó como 100%.

El sobrenadante anterior se fraccionó con sulfato de amonio y se concentró con una membrana de ultrafiltración. Como resultado, a partir de células de la cepa SF-81, se obtuvieron preparaciones de lactasa, preparaciones que tienen una actividad lactasa respectiva de aproximadamente 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 ó 6.000 NLU/g dependiendo del grado de concentración. Por otra parte, no se obtuvo ninguna preparación que tuviera una actividad lactasa de 1.000 NLU/g o mayor a partir de la cepa CBS2359 aunque se llevó a cabo un método de concentración similar.

Ejemplo 13 Preparación de la preparación enzimática

La cepa SF-81 se inoculó en un medio para la producción de lactasa que contenía 7% de licor de maíz fermentado y 2% lactosa, y se incubó a 30 grados Celsius con agitación a 210 rpm durante 96 horas. Después, las células se recogieron por centrifugación. Se añadió agua purificada estéril a las células y las paredes celulares de las células recogidas se disrumpieron con lechos de vidrio y ondas ultrasónicas. El sobrenadante se recogió por centrifugación. El sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio y se concentró con una membrana de ultrafiltración para obtener una preparación de lactasa que tenía una actividad lactasa de aproximadamente 5.000 NLU/g. La actividad arilsulfatasa de esta preparación de lactasa fue 1 U/g o menos según el método de la presente invención (el método de fluorescencia).

Ejemplo 14 Examen organoléptico para sabor (Parte 2)

Preparación de preparaciones de lactasa con varias relaciones de contaminación de arilsulfatasa

Se prepararon cinco preparaciones de lactasa teniendo cada una actividad arilsulfatasa de 1 a 20 U/g según se determina por el método de fluorescencia mostrado en el Ejemplo 7 a partir de la preparación de lactasa per se producida a partir de la cepa SF-81 por el método según se describe en el Ejemplo 13, y mezclando apropiadamente la preparación de lactasa con GODO-YNL2 (preparación de lactasa líquida, producida por Godo Shusei Co. Ltd.). Además, la actividad lactasa de cada preparación de lactasa se determinó por el método FCC IV.

Examen organoléptico para sabor

Como en el Ejemplo 8, cada una de las 5 preparaciones de lactasa se añadió a una leche de vaca disponible comercialmente para tener un contenido de lactasa de 20.000 NLU/L de leche, y las leches de vaca obtenidas se almacenaron a 30 grados Celsius. Después de 1 mes de almacenamiento, se llevó a cabo un examen organoléptico para sabor por un método similar a como se describe en el Ejemplo 8, en el que las leches a las se habían añadido respectivamente las preparaciones de lactasa se compararon con la leche a la que no se había añadido preparación de lactasa. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Resultados del examen organoléptico para sabor (sabor anormal) de leches de vaca que se trataron con preparaciones de lactasa que contenían arilsulfatasa en varias relaciones de contaminación

Preparaciones de lactasa			Sabor anormal
Actividad lactasa (NLU/g)	Actividad arilsulfatasa (U/g)	Actividad arilsulfatasa/Actividad lactasa (%)	Periodo de tiempo de reacción: 1 mes
No añadida			-
5.000	1 o menos	0,02 o menos	-
5.000	5	0,1	-
5.000	10	0,2	+

ES 2 617 508 T3

5.000	15	0,3	+
5.000	20	0,4	+

+ : consciente;

- : no consciente

5 A partir de los resultados mostrados en la Tabla 13, se ha concluido que la actividad arilsulfatasa según se determina por el método según la presente invención es preferiblemente 5 U/g o menos. Además, se ha demostrado que la proporción de actividad arilsulfatasa (unidad: U/g) según se determina por el método según la presente invención es preferiblemente 0,1% o menos usando la actividad lactasa (unidad: NLU/g) por el método FCC IV como la base.

Listado de secuencias

<110> GODO SHUSEI CO., LTD.

<120> Método para determinar la actividad de α -Aylsulfatasa

<130> GS11001

5 <160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

10 <213> Kluyveromyces lactis

<400> 1

atgaccaaaa cagatgaacc ta 22

<210> 2

<211> 19

15 <212> DNA

<213> Kluyveromyces lactis

<400> 2

ccagtctctt gcgtcgtga 19

<210> 3

20 <211> 28

<212> DNA

<213> Kluyveromyces lactis

<400> 3

gaagatctca gacctgaggt aacgtttc 28

25 <210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Kluyveromyces lactis

<400> 4

30 ctgggtaact tgttctggtg 20

<210> 5

<211> 59

<212> DNA

<213> Kluyveromyces lactis

35 <400> 5

atcgaatggt ttgagcggta ctgacaacca ttggcaggt tcatcaaca cacgagccg 59

<210> 6

<211> 53

<212> DNA

40 <213> Kluyveromyces

<400> 6

atcgataact ctaccgatat ttgggtctaa tcatcaacc actggtggtg gag 53

REIVINDICACIONES

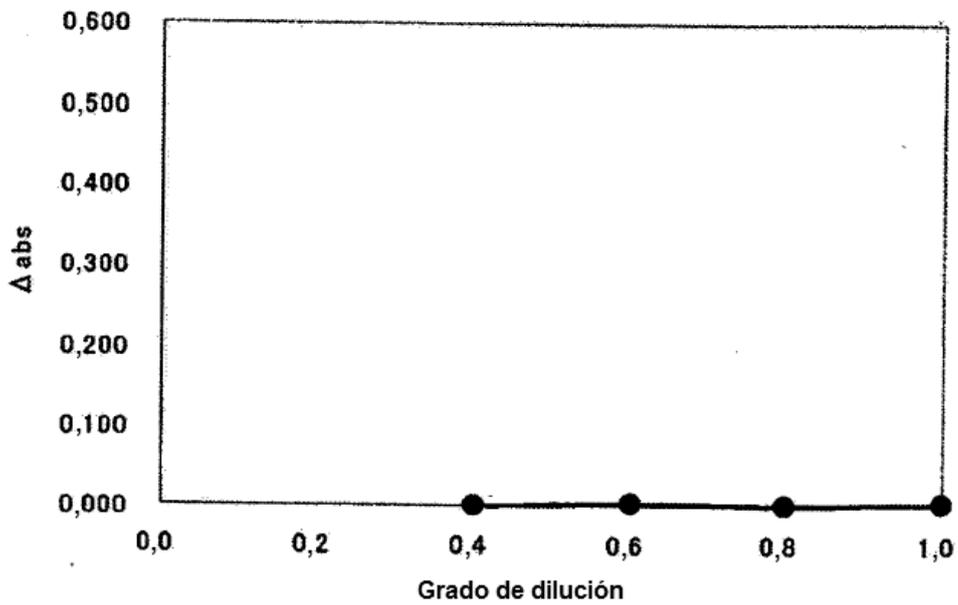
1. Un método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso caracterizado porque la arilsulfatasa obtenida a partir de levadura se somete a reacción con un sustrato, del que se libera un fluoróforo al experimentar la acción de la arilsulfatasa, en un sistema de reacción acuoso que tiene alta fuerza iónica al que se ha añadido una sal inorgánica, en el que la concentración de la sal inorgánica en el sistema de reacción acuoso varía de 50 a 500 mM.
2. El método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la reivindicación 1, en el que el medio para la reacción en un sistema de reacción acuoso que tiene alta fuerza iónica es uno en el que la enzima se somete a reacción con un sustrato en un tampón que no desnaturaliza la proteína enzimática.
3. El método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la reivindicación 2, en el que la concentración del tampón es 50 a 200 mM.
4. El método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sal inorgánica es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en cloruro de potasio, cloruro de sodio, y sulfato de amonio.
5. El método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el tampón es un tampón fosfato.
6. El método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según la reivindicación 1 que comprende las etapas (1) a (10) siguientes:
- (1) un espécimen en el que se predice la existencia de la arilsulfatasa se diluye arbitrariamente con tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que comprende cloruro de potasio 0,5 M para obtener una muestra,
- (2) se prepara una disolución acuosa que comprende sulfato potásico de 4-metilumbeliferona en una concentración de 2 mM,
- (3) la muestra y la disolución acuosa de sulfato potásico de 4-metilumbeliferona se mezclan entre sí a una relación de 1:1 (en volumen) y se hacen reaccionar a 37 grados Celsius durante 3 horas,
- (4) a la disolución reaccionada, se añade una disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N que tiene la misma cantidad (en volumen) que la de la disolución reaccionada para parar la reacción, obteniendo así una muestra para determinación,
- (5) se determina la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 450 nm,
- (6) se disuelve 4-metilumbeliferona en tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que comprende cloruro de potasio 0,5 M para obtener una disolución que tiene una concentración apropiada, se añade disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N de una manera similar a la de en la etapa (4), y se determina la intensidad de la fluorescencia en las mismas condiciones que aquellas en la etapa (5),
- (7) a partir de la etapa (6), se prepara una curva de calibración,
- (8) a partir de la intensidad de la fluorescencia que se determinó en la etapa (5) y la curva de calibración que se preparó en la etapa (7), se calcula la concentración de 4-metilumbeliferona de la muestra para determinación, y el valor calculado se divide por 3, obteniendo así la concentración de la 4-metilumbeliferona en el caso en el que el periodo de tiempo de la reacción es 1 hora; además, a partir del volumen de la disolución reaccionada, se calcula la cantidad de la 4-metilumbeliferona que se liberó por la reacción de una hora,
- (9) debido a que la cantidad de la 4-metilumbeliferona así calculada se basa en la cantidad del espécimen que estaba contenido en la muestra preparada en la etapa (1), la cantidad calculada se convierte en la de la 4-metilumbeliferona por 1 g del espécimen, y
- (10) cuando la cantidad de la 4-metilumbeliferona que se liberó por 1 hora del periodo de tiempo de la reacción del sustrato y la enzima es 1 nmol, se define como 1 unidad (U), y la unidad se muestra como una cantidad unitaria por 1 g del espécimen (es decir, una preparación de enzima), concretamente, "unidad (U)/g".
7. El método para determinar la actividad de arilsulfatasa en un sistema acuoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un método para determinar la actividad de arilsulfatasa en una preparación de lactasa.
8. Una preparación de lactasa producida mediante el uso, como un material bruto, de células de levadura o microorgánicas cultivadas y/o fluido de cultivo de estas células, en el que las células de levadura o microorgánicas son las de una cepa diploide de levadura tiene un gen de lactasa, en la que la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, o un microorganismo recombinante genético en el que un gen de lactasa de levadura se ha

transformado y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, y preparada sin una etapa para eliminar arilsulfatasa, caracterizada porque la preparación de lactasa tiene una actividad lactasa de 4.000 NLU/g o más según el método FCC IV y tiene una actividad arilsulfatasa de 0,1% o menos de la actividad lactasa como la base, en la que la actividad arilsulfatasa (unidad: U/g) se ha determinado y calculado por el método de la reivindicación 6.

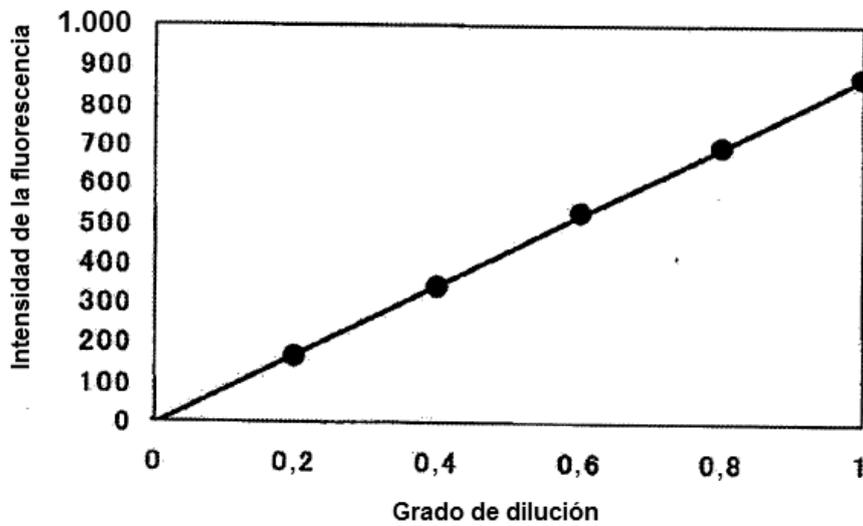
- 5 9. La preparación de lactasa según la reivindicación 8, en la que la actividad arilsulfatasa (unidad: U/g) es 0,02% o menos de la actividad lactasa (unidad: NLU/g) según el método FCC IV como la base.

- 10 10. Un método para producir una preparación de lactasa caracterizado por cultivar una cepa diploide de levadura que tiene un gen de lactasa, en la que la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida, o un microorganismo recombinante genético en el que un gen de lactasa de levadura se ha transformado y la expresión de la proteína arilsulfatasa está restringida; recoger las células de levadura o microorgánicas sin destruir sus paredes celulares, recoger el fluido de cultivo con células de levadura o microorgánicas después de la destrucción de sus paredes celulares, o recoger el fluido de cultivo sin destruir las paredes celulares; y preparar una preparación de lactasa que tiene una actividad lactasa de 4.000 NLU/g o más según el método FCC IV y una actividad arilsulfatasa de 0,1% o menos de la actividad lactasa como la base, en la que la actividad arilsulfatasa (unidad: U/g) se ha determinado y calculado por el método de la reivindicación 6, mediante el uso, como un material bruto, de las células de levadura o microorgánicas recogidas y/o el fluido de cultivo recogido sin una etapa para eliminar arilsulfatasa.
- 15

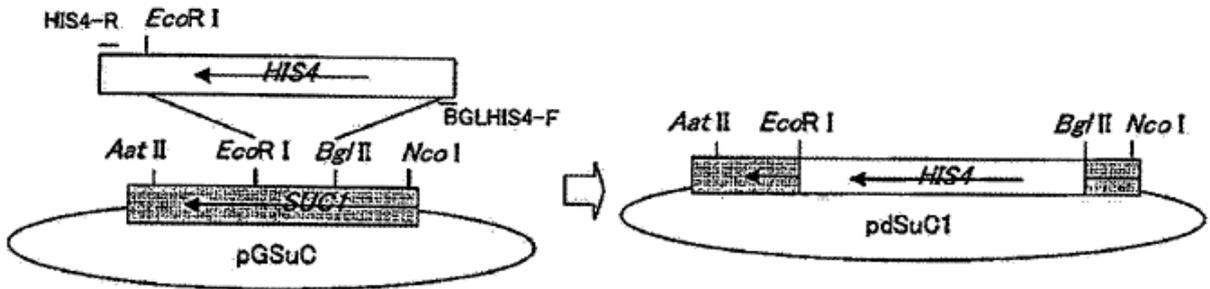
[Fig. 1] Linealidad de la dilución del método colorimétrico (disolución al 1% (p/v) de GODO-YNL2)



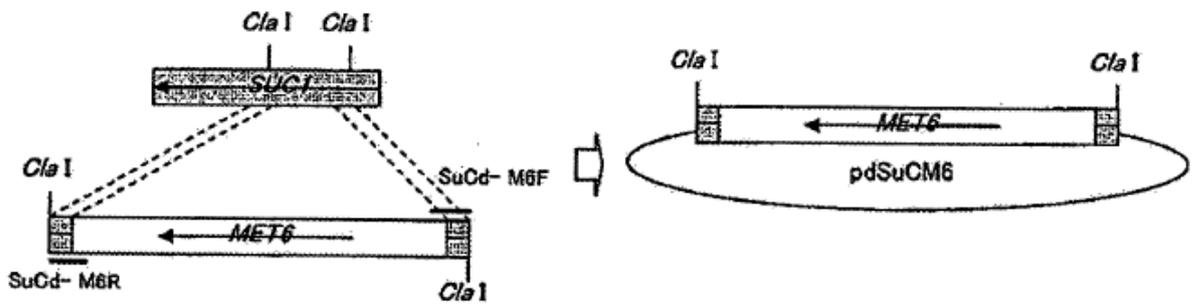
[Fig. 2] Linealidad de la dilución del método de fluorescencia (disolución al 1% (p/v) de GODO-YNL2)



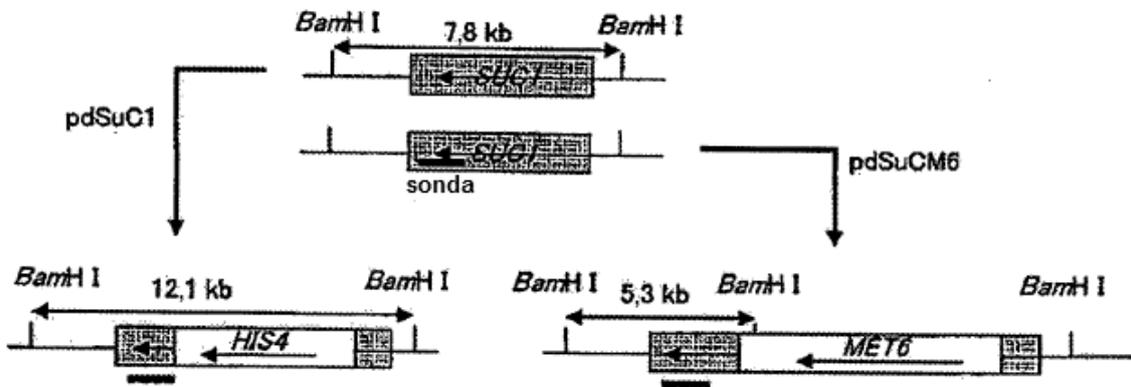
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

