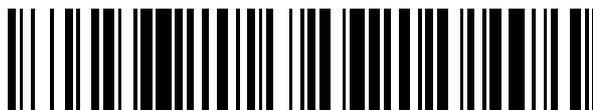


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 422**

51 Int. Cl.:

C12N 9/38

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2015 PCT/EP2015/050503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2015 E 15700373 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 3094723**

54 Título: **Variantes enzimáticas mejoradas de lactasa de Kluyveromyces lactis**

30 Prioridad:

14.01.2014 EP 14151124

26.05.2014 EP 14169816

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

30.05.2018

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon, 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

JONG, DE, RENÉ MARCEL;

MÜLLER, ULRIKE MARIA y

DEKKER, PETRUS JACOBUS THEODORUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 670 422 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

Variantes enzimáticas mejoradas de lactasa de *Kluyveromyces lactis*

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa. La invención también se refiere a una
 10 secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante de este tipo, a una estructura artificial de ácido
 nucleico que comprende dicha secuencia de ácido nucleico, a un vector de expresión recombinante que comprende
 dicha estructura artificial de ácido nucleico y a una célula hospedadora recombinante que comprende dicho vector
 de expresión. Además, la invención se refiere a un método para producir una variante de lactasa mediante el uso de
 tal célula hospedadora. También, la invención se refiere a un método para producir una variante de polipéptido de
 15 lactasa. La invención se refiere además a una composición que comprende una variante de lactasa, al uso de tal
 variante de lactasa o al uso de una composición que contiene una variante de lactasa en la preparación de un pro-
 ducto lácteo y a un procedimiento para la producción de un producto lácteo.

Antecedentes de la invención

15 Esta invención se refiere a la lactasa. La lactasa o beta-galactosidasa (E.C: 3.2.1.23) es una enzima, que cataliza la
 hidrólisis de la lactosa (un disacárido) en sus componentes monosacáridos glucosa y galactosa. La lactosa está
 presente en los productos lácteos y más concretamente en la leche, leche desnatada, crema, helados, productos
 lácteos fermentados como el yogur, muchos quesos jóvenes y otros productos lácteos. La descomposición de la
 lactosa se produce en la pared intestinal de mamíferos jóvenes (entre los que se encuentran los seres humanos)
 20 debido a la presencia natural de lactasa. Solo una pequeña parte de la población adulta no ha perdido esta propie-
 dad y todavía puede digerir la lactosa. Los problemas nutricionales y funcionales causados por la lactosa en la ma-
 yoría de los adultos son debidos a una falta de lactasa y son bien conocidos y se han descrito. Los miembros de
 tales poblaciones no pueden hidrolizar la lactosa, que en tales casos pasa al intestino grueso en donde produce
 deshidratación, mala absorción de calcio, flatulencia, eructos y calambres, y en casos graves, incluso diarrea explo-
 siva acuosa.

25 Una aplicación industrial importante de la lactasa es en la producción de productos lácteos con lactosa hidrolizada
 para los individuos intolerantes a la lactosa. Tales productos lácteos hidrolizados incluyen leche pasteurizada, leche
 UHT y leche reconstituida a partir de la totalidad o de parte de sus constituyentes originales con o sin etapas de
 procesamiento intermedias, tales como la hidrólisis de proteínas. El tratamiento con lactasa se puede realizar antes
 o después del tratamiento térmico de la leche. El tratamiento con lactasa se puede realizar mediante la adición de la
 30 enzima a la leche o a uno de sus constituyentes que contienen lactosa.

Las propiedades de solubilidad de la lactosa son tales que puede conducir a su cristalización cuando está presente
 en una concentración elevada, lo que conduce a una textura arenosa o rasposa en productos lácteos como leche
 condensada, leche evaporada, leche en polvo, leche congelada, helado y en productos de confitería con un alto
 contenido en leche. Una hidrólisis total o parcial de la lactosa con lactasa elimina este problema, proporcionando
 35 productos con una textura homogénea y, como resultado, una mayor aceptación de los consumidores.

Otra aplicación industrial de la lactasa es aumentar el sabor dulce de productos que contienen lactosa, como la le-
 che o el yogur. La hidrólisis de la lactosa en tales productos da lugar a un aumento del sabor dulce como resultado
 de la producción de glucosa, mientras que el valor calórico del producto no aumenta. Por el contrario, el uso de lac-
 tasa también puede disminuir la adición de azúcar en productos lácteos azucarados, sin comprometer el sabor dul-
 40 ce.

Otra aplicación industrial de la lactasa es la hidrólisis de productos de lactosa que contienen componentes lácteos
 tales como pan. La lactosa se añade a tales productos para mejorar el sabor, conservar la humedad, proporcionar el
 color dorado y mejorar las propiedades del tostado. Los jarabes con lactosa hidrolizada son prometedores en térmi-
 nos de, por ejemplo, la mejora del desarrollo del color de la corteza, la mejora del sabor y el aroma, la modificación
 45 de la textura, la prolongación de la vida útil y el fortalecimiento de la estructura de la barra de pan.

La hidrólisis de la lactosa con lactasa en productos lácteos fermentados como el yogur aumentará el sabor dulce.
 Además, cuando se añade la lactasa antes del comienzo del proceso de fermentación, puede aumentar la tasa de
 desarrollo de ácido y, por lo tanto, reducir los tiempos de procesamiento. El tratamiento con lactasa de la leche o de
 productos derivados de la leche tales como suero de leche, hace que tales productos sean adecuados para una
 50 aplicación en la alimentación animal y alimentos para mascotas, para los animales intolerantes a la lactosa, tales
 como los gatos. La hidrólisis de la lactosa permite la fabricación de suero de leche más concentrado y al mismo
 tiempo evita los problemas intestinales, similares a los descritos anteriormente para pacientes con falta de lactosa.
 El suero de leche con lactosa hidrolizada se concentra para producir un jarabe que contiene 70-75% de sólidos y se
 utiliza como un ingrediente alimenticio en los helados, productos de panadería y confitería.

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

5 *la y Torulopsis* son una fuente común de lactasas de levadura, mientras que *B. coagulans*, *B. circulans* o bacterias del ácido láctico son fuentes bien conocidas de lactasas bacterianas. Diversas preparaciones comerciales de lactasa, obtenidas a partir de estos organismos están disponibles, tales como Maxilact® (procedente de *K. lactis*, producida por DSM, Delft, Países Bajos). Estas lactasas se denominan lactasas neutras, ya que tienen un pH óptimo entre pH = 6 y pH = 8.

Aunque las lactasas neutras de levadura se utilizan frecuentemente en la industria para producir productos lácteos sin lactosa o con lactosa reducida, el coste en uso para el tratamiento enzimático suele ser elevado. Las razones principales para el alto coste en uso de la enzima relativa son:

- 10 • Con el fin de mantener unas condiciones higiénicas en la planta de producción, la incubación se realiza a baja temperatura. A esta temperatura las lactasas empleadas industrialmente no son muy activas y se deben añadir en una dosificación relativamente elevada.
- 15 • Las lactasas utilizadas actualmente son inhibidas por sus productos, especialmente la galactosa, en etapas posteriores de la incubación con lactasa. Cuando se requieren productos con una baja concentración de lactosa residual, se tiene que añadir enzima adicional para compensar la reducción de la actividad debida a una acumulación de galactosa.
- La lactasa utilizada actualmente tiene una actividad específica relativamente baja en la leche, lo que requiere el uso de una dosificación elevada de la enzima en la aplicación.

En consecuencia, la dosificación de la enzima y los costes para la producción de productos con lactosa reducida y exentos de lactosa son relativamente elevados.

20 Es evidente que existe una necesidad de una variante o variantes múltiples de la lactasa, capaces de superar al menos una de las desventajas mencionadas anteriormente.

La base de datos Uniprot [en línea] 11 de julio 2012, recuperada a partir del número de acceso de EBI UNIPROT:I2JQJ6, describe una beta-galactosidasa prevista de 495 aminoácidos.

25 R. Mahoney et al. (Thermostability of yeast lactase (*Kluyveromyces marxianus*) in milk, *Journal of Dairy Research*, 1988, páginas 423-433) describen la estabilidad térmica de la lactasa de levadura en la leche y diversos medios sintéticos.

30 S. Bansal et al. (Production of beta-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on beta-galactosidase activity, *Indian Journal of Microbiology*, 2008, páginas 337-341) evalúan diferentes métodos para la extracción de beta-galactosidasa a partir de *Kluyveromyces marxianus*.

N. Lertwattanasakul et al. (Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, *AMB Express*, 2011, páginas 1:20) describen las capacidades de la fermentación con *K. marxianus* de sus sustratos, sacarosa, rafinosa e inulina, en presencia y en ausencia de glucosa a diferentes temperaturas.

35 N. Rodrussamee et al. (Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, páginas 1573-1586) describen el potencial de *K. marxianus* para la utilización y la producción de etanol a partir de azúcares presentes en el hidrolizado de hemicelulosa en condiciones diferentes.

Compendio de la invención

40 La invención describe un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, es decir, una variante de lactasa. Una variante de lactasa puede tener una o varias propiedades mejoradas en comparación con un polipéptido de referencia, teniendo el polipéptido de referencia actividad de lactasa. Un polipéptido de referencia puede ser una lactasa de tipo silvestre, por ejemplo, la lactasa procedente de *K. lactis*. Los polipéptidos variantes se pueden denominar "variante de lactasa", "lactasa mejorada" y similares. Las variantes de la lactasa neutra de *Kluyveromyces* se generaron de modo que tuvieran propiedades que conducen a una reducción del coste en uso de tales lactasas en la producción de productos lácteos con lactosa reducida o sin lactosa. Una variante de lactasa con una propiedad mejorada relevante para la producción de leche puede mostrar:

- una actividad específica más alta sobre ONPG;
- una actividad específica más alta sobre la lactosa;
- 50 • una actividad más alta sobre la lactosa en la leche a baja temperatura;
- una reducción de la inhibición con galactosa; y/o

- una producción más alta de GOS en la leche.

Cada una de estas mejoras se puede determinar en comparación con un polipéptido de referencia. Además, un polipéptido variante puede tener por lo menos 2 o 3 o 4 propiedades mejoradas, en comparación con un polipéptido de referencia. La Tabla 1 proporciona ejemplos de combinaciones de propiedades mejoradas.

- 5 De acuerdo con la invención, se proporciona por tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

- 10 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una o varias propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

La invención también proporciona:

- una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de la invención;
- 15
- una estructura artificial de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de este tipo ligada funcionalmente a una o a varias secuencias de control capaces de dirigir la expresión de una lactasa en un hospedador de expresión adecuada;
 - un vector de expresión recombinante que comprende una estructura artificial de ácido nucleico de este tipo;
- 20 y
- una célula hospedadora recombinante que comprende un vector de expresión de este tipo.

La invención también se refiere a un método para producir una lactasa que comprende cultivar la célula hospedadora de la invención en condiciones propicias para la producción de la lactasa y la recuperación de la lactasa.

Además, la invención se refiere a un método para producir una variante de polipéptido de lactasa, cuyo método comprende:

- 25 a) la selección de un polipéptido que tiene actividad de lactasa;
- b) la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos 233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2;
- c) la sustitución opcional de uno o varios aminoácidos adicionales tal como se define en b);
- 30 d) la preparación de la variante que resulta de las etapas a) - c);
- e) la determinación de una propiedad de la variante; y
- f) la selección de una variante que tiene una propiedad alterada en comparación con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 y la selección de una variante que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, para producir de este modo una variante de polipéptido de lactasa.

- 35 Además, la invención se refiere a:

- una composición que comprende la variante de la invención o que se puede obtener por un método de la invención;
 - un uso de una lactasa variante de acuerdo con la invención o de una composición de la invención en la preparación de un producto lácteo; y
- 40
- un procedimiento para la producción de un producto lácteo, cuyo método comprende la adición de una cantidad efectiva de una lactasa variante de acuerdo con la invención o de una composición de la invención a la leche y la realización de etapas de fabricación adicionales más apropiadas del producto lácteo.

Breve descripción de la lista de secuencias

SEQ ID NO 1 expone la secuencia de ácido nucleico de la secuencia del gen de lactasa de tipo silvestre procedente

de *K. lactis*

SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de aminoácidos de la secuencia de lactasa procedente de *K. lactis*.

Descripción detallada de la invención

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprenden", "incluyen" y "que tienen" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" deben interpretarse de manera inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros que no se citan específicamente, cuando el contexto lo permita.

10 Los artículos "un" y "una" se emplean en esta memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

En este documento, "lactasa" o beta-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) es una enzima, que cataliza la hidrólisis de la lactosa (un disacárido) en sus monosacáridos componentes glucosa y galactosa. Los galacto-oligosacáridos (GOS) se pueden formar durante esta reacción debido a la actividad transferasa de la enzima lactasa.

La lactasa se encuentra en el intestino de mamíferos jóvenes, en plantas, hongos, levaduras y bacterias.

15 La lactasa puede ser una lactasa neutra o ácida. Preferiblemente, el polipéptido variante tiene actividad de lactasa neutra, es decir, que tiene su pH óptimo entre pH = 6 y pH = 8.

La lactasa puede ser una lactasa producida de forma intracelular o extracelular. Preferiblemente, la lactasa se produce de forma intracelular.

20 Un gen o ADNc que codifica la lactasa, por ejemplo, una variante de la invención, se puede clonar y sobreexpresar en un organismo hospedador. Los organismos hospedadores bien conocidos que se pueden utilizar para sobreexpresar la lactasa incluyen *Aspergillus*, *Kluyveromyces*, *Trichoderma*, *Escherichia coli*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Neurospora*, *Lactococcus* o *Bacillus*.

En la presente memoria, las posiciones que se pueden sustituir para lograr una variante de la invención se definen con referencia a SEQ ID NO: 2 que es la lactasa de *K. lactis*.

25 La invención se refiere a un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa. El polipéptido de referencia puede ser normalmente un polipéptido de tipo silvestre que tiene actividad de lactasa, como la lactasa de SEQ ID NO: 2 o una secuencia relacionada. El polipéptido de referencia también puede ser denominado un polipéptido parental o polipéptido de comparación.

30 Más concretamente, la invención se refiere a un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

35 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una o varias propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

Un polipéptido de referencia de tipo silvestre se puede obtener a partir de cualquier organismo adecuado. Normalmente, un polipéptido de referencia de tipo silvestre se puede obtener a partir de un microorganismo, preferiblemente uno en el que la lactasa se produce de forma natural.

40 Un microorganismo de este tipo incluye una levadura tal como *Kluyveromyces*. Un polipéptido de referencia puede ser una secuencia de tipo silvestre de *K. lactis*.

Preferiblemente, el polipéptido de referencia es la lactasa expuesta en SEQ ID NO: 2.

Un polipéptido variante tal como se describe en la presente memoria, es normalmente un polipéptido de origen no natural.

45 De acuerdo con la invención, se proporciona por tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una o varias propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

5 Un polipéptido variante tendrá al menos una propiedad mejorada en comparación con un polipéptido de referencia, en particular con respecto a una propiedad relevante para el uso del polipéptido variante en un procedimiento para preparar un producto lácteo.

En particular, la propiedad mejorada se puede relacionar con la actividad o la actividad específica o con una reducción de la inhibición con galactosa o con una mayor producción de GOS en la leche.

10 La Tabla 1 expone las posiciones que influyen sobre propiedades específicas de las lactasas variantes de las invenciones.

Tabla 1: Sustituciones preferidas definidas en relación con SEQ ID NO: 2. Se indican diferentes propiedades tales como la actividad específica sobre ONPG o lactosa como sustrato, la actividad en leche a baja temperatura, la reducción de la inhibición de la actividad de lactasa mediante galactosa y una producción mayor de galactooligosacárido en la leche

	variante preferida	la más preferida	act. espec. sobre ONPG	act. espec. sobre lactosa	act. en la leche	reducción de la inh. de gal	prod. elevada de GOS
T633	todos los AA	G	x		x		
Y440	todos los AA	F		x	x		
A483	todos los AA	S	x	x			
A1004	todos los AA	P			x		
A258	todos los AA	T			x		
D233	todos los AA	V			x		
N263	todos los AA	S			x		
K274	todos los AA	E			x		
N284	todos los AA	S			x		
D257	todos los AA	G			x		
E297	todos los AA	G			x		
L862	todos los AA	V			x		
V619	todos los AA	I	x		x	x	x
T415	todos los AA	C, A	x	x			
M622	todos los AA	L	x			x	x
I621	todos los AA	V	x			x	

15

Un polipéptido variante de la invención puede mostrar una mayor actividad específica sobre ONPG.

La invención proporciona por lo tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

20

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una mayor actividad específica sobre ONPG en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID

NO: 2.

5 Preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

415, 483, 619, 621, 622 o 633

10 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una mayor actividad específica sobre ONPG en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Se prefiere al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos 415 y/o 619, estando definida dicha posición con referencia a SEQ ID NO: 2.

Más preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de

15 T415C, T415A, A483S, V619I, I621V, M622L o T633G,

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una mayor actividad específica sobre ONPG en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Se prefiere la sustitución T415C y/o V619I, estando definida dicha posición con referencia a SEQ ID NO: 2.

20 Otro polipéptido variante de la invención puede mostrar una mayor actividad específica sobre la lactosa. Ya que la lactosa es el sustrato natural en los productos lácteos de lactasa, una mayor actividad específica del polipéptido variante puede conducir a una reducción de la dosificación requerida de la enzima y, por lo tanto, puede conducir a un menor coste del tratamiento. Mediante la reducción de la dosificación de la enzima en la aplicación, también se reduce la cantidad de actividades secundarias añadidas, y por lo tanto cabe esperar una mayor calidad del producto lácteo final.

25 La invención proporciona por tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

30 233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una actividad específica más alta sobre la lactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

35 Preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

415, 440 o 483

40 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una mayor actividad específica sobre la lactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Se prefiere al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos 415 y/o 483 (esta preferencia se basa en el análisis de variantes de la lactasa que comprenden una combinación de sustituciones), estando definida dicha posición con referencia a SEQ ID NO: 2.

Más preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de

T415C, T415A, Y440F o A483S,

50 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una mayor actividad específica sobre la lactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Se prefiere la sustitución T415A, T415C y/o A483S (esta preferencia se basa en el análisis de variantes de

la lactasa que comprenden una combinación de sustituciones), estando definida dicha posición con referencia a SEQ ID NO: 2.

5 Aún más preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

10 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una mayor actividad específica sobre la lactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

Ejemplos de tales mutantes son los mutantes 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36, tal y como se describen en la Tabla 5.

15 Todavía otro polipéptido variante de la invención puede mostrar una mayor actividad sobre la lactosa en la leche, preferiblemente a bajas temperaturas (preferiblemente dichas bajas temperaturas están en el intervalo de 4-12°C). Ya que frecuentemente las lactasas se utilizan en la leche a una temperatura baja, un aumento de la actividad del polipéptido variante en esta aplicación específica puede conducir a la reducción de la dosificación de la enzima y, por lo tanto, a reducir los costes. Adicionalmente, una mayor actividad del polipéptido variante puede conducir a una reducción en el tiempo de procesamiento de la leche y, por lo tanto, a reducir el riesgo de posible deterioro microbiano.

20 La invención proporciona por lo tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

25 233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a baja temperatura en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

30 Preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 440, 619, 633, 862 o 1004

35 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a baja temperatura en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Se prefiere una sustitución de (al menos) un residuo de aminoácido que se corresponde con el aminoácidos 440, estando definida dicha posición con referencia a SEQ ID NO: 2 (esta preferencia se basa en un análisis de variantes de la lactasa que comprenden una combinación de sustituciones). Una combinación preferida de sustituciones es una sustitución en la posición 440 y 619.

40 Más preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de

45 D233V, D257G, A258T, N263S, K274E, N284S, E297G, Y440F, V619I, T633G, L862V o A1004P

50 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a baja temperatura en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. Se prefiere una sustitución de (al menos) Y440F, estando definida dicha posición con referencia a SEQ ID NO: 2 (esta preferencia se basa en un análisis de variantes de la lactasa que comprenden una combinación de sustituciones). Una combinación preferida de sustituciones es Y440F+V619I.

A pesar de que la presencia de al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 440, 619, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2,

es suficiente para obtener un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa y que además muestra un aumento de la actividad sobre la lactosa en la leche a temperatura baja, se muestra en el presente documento que también las variantes de polipéptidos mutadas de forma doble o triple muestran una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a temperatura baja.

Como resultado, la invención también proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos dos sustituciones seleccionadas a partir de 263, 274 o 284 (más preferiblemente N263S, K274E o N284S) estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a baja temperatura en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2

La invención proporciona además un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende sustituciones en las posiciones 263, 274 y 284 (preferiblemente dichas sustituciones son N263S, K274E y N284S)

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a baja temperatura en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

La invención proporciona además un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende sustituciones en las posiciones 257 y 297 (preferiblemente dichas sustituciones son D257G y E297G),

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a baja temperatura en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

La invención también proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos tres, cuatro o cinco sustituciones de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor actividad sobre la lactosa en la leche a baja temperatura en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

Ejemplos de tales mutantes son los mutantes 15, 17, 18, 19, 20, 21 o 22, tal y como se describen en la Tabla 5.

Todavía un polipéptido variante adicional de la invención puede mostrar una reducción de la inhibición con galactosa. La inhibición con galactosa produce una reducción de la hidrólisis de la lactosa en puntos de tiempo posteriores, cuando la concentración de lactosa es baja, y la concentración de galactosa es alta. Por consiguiente, sería deseable disponer de una enzima lactasa que tenga una inhibición reducida con galactosa, especialmente cuando se desea producir un producto lácteo en el que la concentración de la lactosa sea inferior a 0,5 g/L.

La invención proporciona por lo tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una disminución

de la inhibición con galactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

5 Preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

619, 621 o 622

10 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una disminución de la inhibición con galactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

15 Más preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de

V619I, I621V o M622L

20 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una disminución de la inhibición con galactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

25 Todavía un polipéptido variante adicional de la invención puede mostrar una mayor producción de GOS en la leche. Los GOS (galacto-oligosacáridos) son prebióticos que se definen como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al hospedador mediante la estimulación del crecimiento y/o la actividad de bacterias beneficiosas en el colon. No todas las lactasas están igualmente capacitadas para la preparación de GOS. Sería deseable tener otra enzima lactasa que sea capaz de acumular GOS a la concentración baja de lactosa que está presente en la leche (<50 g/L).

30 La invención proporciona por tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

35 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor producción de GOS en la leche en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

40 Preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

619 o 622

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor producción de GOS en la leche en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

45 Más preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de

V619I o M622L

50 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante muestra una mayor producción de GOS en la leche en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

Una variante de lactasa de la invención también puede comprender modificaciones adicionales en comparación con la parental en posiciones distintas de las especificadas anteriormente, por ejemplo, una o varias sustituciones, adiciones o deleciones adicionales. Una variante de la invención puede comprender una combinación de tipos diferentes de modificaciones de este tipo. Una variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más modificaciones de este tipo (que pueden ser todas del mismo tipo o pueden ser diferentes tipos de modificaciones). Normalmente, las modificaciones adicionales pueden ser sustituciones. La invención también proporciona por tanto un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una o varias propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa y en donde dicho polipéptido variante comprende sustituciones adicionales distintas de las definidas y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

Una variante de acuerdo con la invención (por ejemplo, una variante que tiene una o varias sustituciones tal como se expone en la Tabla 1 o la Tabla 2) tiene al menos 80% de homología/identidad con SEQ ID NO: 2, por ejemplo, al menos aproximadamente 85% de homología con el polipéptido parental, tal como al menos aproximadamente 90% de homología con el polipéptido parental, al menos 95% de homología con el polipéptido parental, al menos aproximadamente 98% de homología con el polipéptido parental o al menos aproximadamente 99% de homología con el polipéptido parental. Una variante de este tipo tendrá normalmente una o varias sustituciones o conjuntos de sustituciones tal como se expone en la Tabla 1 o la Tabla 2.

Una variante de la invención conservará la actividad de lactasa. Es decir, una variante de la invención será capaz de convertir la lactosa en glucosa y galactosa o una variante de la invención será capaz de convertir la lactosa en glucosa y galactosa, y será capaz de formar GOS. Una variante de la invención es una que es capaz de realizar una conversión enzimática de la lactosa y que se puede utilizar en la preparación de un producto lácteo, tal como leche o yogur.

Una variante de la invención mostrará propiedades mejoradas en comparación con el polipéptido de lactasa de referencia a partir del cual se obtiene. Una propiedad mejorada de este tipo normalmente será una que es relevante si la variante es para ser utilizada como se indica a continuación, por ejemplo, en un método para preparar un producto lácteo.

Una variante de polipéptido que muestra una propiedad que está mejorada en relación con la lactasa de referencia, es una que muestra una reducción o un aumento medible de la propiedad relevante, normalmente de tal manera que la variante es más adecuada para el uso tal y como se expone a continuación, por ejemplo, en un método para la producción de un producto lácteo.

La propiedad se puede reducir por tanto en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 99%. Alternativamente, la propiedad se puede incrementar en al menos un 10%, al menos un 25%, al menos un 50%, al menos un 100%, al menos un 200%, al menos un 500% o al menos un 1000%. El porcentaje de reducción o aumento en este contexto representa el porcentaje de reducción o aumento en comparación con el polipéptido de lactasa de referencia. Una persona experta conoce bien cómo se pueden medir tales cambios porcentuales - es una comparación de la actividad de la lactasa de referencia y la lactasa variante.

Las variantes descritas en este documento están comprendidas colectivamente en las expresiones "un polipéptido de acuerdo con la invención" o "una variante de acuerdo con la invención".

Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se acepta comúnmente) y cada término puede usarse indistintamente cuando el contexto requiera indicar una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados por enlaces peptídico. La palabra "polipéptido" se usa en este documento para cadenas que contienen más de aproximadamente siete residuos de aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos en este documento se escriben de izquierda a derecha y en dirección desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal. El código de una letra para los aminoácidos, utilizado en este documento se conoce comúnmente en la técnica y se puede encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Un polipéptido de la invención puede estar en forma aislada, tal como una forma sustancialmente aislada. Por polipéptido o proteína "aislados" se entiende un polipéptido o una proteína eliminados de su entorno natural. Por ejemplo, los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante, expresados en células hospedadoras se consideran aislados para los fines de la invención, ya que son polipéptidos recombinantes que se han purificado sustancialmente por cualquier técnica adecuada. Una variante de polipéptido de acuerdo con la invención se puede recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos conocidos en la técnica.

5 Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos por técnicas recombinantes procedentes de un hospedador procarionta o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de hongos, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden estar no glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo de metionina inicial modificado, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedador.

La invención también describe fragmentos biológicamente activos de las variantes de polipéptido de acuerdo con la invención. Tales fragmentos se consideran que están incluidos dentro de la expresión "una variante de la invención".

10 Los fragmentos biológicamente activos de una variante de polipéptido de la invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas u obtenidas a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína variante de la invención, que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, pero que muestran al menos una actividad biológica de la proteína de longitud completa correspondiente. Normalmente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o un motivo con al menos una actividad de una proteína variante de la invención. Además, otras porciones biológicamente activas, en las que se eliminan otras regiones de la proteína, se pueden preparar por técnicas recombinantes y evaluar en relación con una o varias de las actividades biológicas de la forma natural de un polipéptido de la invención.

Un fragmento de proteína comprenderá una o varias de las sustituciones definidas en el presente documento.

20 La presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica los polipéptidos variantes de la invención. La invención también proporciona por tanto una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

25 estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una o varias propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

30 Tal y como se usa en el presente documento, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que incluyen un marco de lectura abierto que codifica una variante tal y como se describe en el presente documento. Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes, intrones y secuencias reguladoras. Es decir, un "gen", tal y como se usa en el presente documento, se puede referir a una molécula de ácido nucleico aislada como se define en este documento. Por consiguiente, el término "gen", en el contexto de la presente solicitud, no se refiere solamente a secuencias de origen natural.

35 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede generar utilizando técnicas de biología molecular convencionales, bien conocidas por los expertos en la técnica, tomadas en combinación con la información de la secuencia proporcionada en este documento.

Por ejemplo, utilizando técnicas de síntesis convencionales, la molécula de ácido nucleico requerida se puede sintetizar de nuevo. Un proceso sintético de este tipo será normalmente un proceso automatizado.

40 Alternativamente, una molécula de ácido nucleico de la invención se puede generar mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio de una molécula de ácido nucleico existente, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de tipo silvestre. La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo usando una serie de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

45 Un "polinucleótido aislado" o un "ácido nucleico aislado" es un ADN o ARN que no está justamente adyacente a ambas secuencias codificantes con las que está justamente adyacente (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo a partir del cual se obtiene. Por tanto, un ácido nucleico aislado puede incluir algunas o todas las secuencias 5' no codificantes (por ejemplo, promotoras) que están justamente adyacentes a la secuencia codificante. La expresión incluye por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota, o que existe como una molécula distinta (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que está sustancialmente exento de material celular, material vírico o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante) o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no es de origen natural como fragmento, y no se encontraría en estado natural.

Tal y como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" se entien-

de que incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando nucleótidos análogos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. El ácido nucleico se puede sintetizar usando análogos o derivados de oligonucleótidos (por ejemplo, inosina o nucleótidos de fosforotioato). Tales oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen una capacidad para emparejar bases alteradas o una resistencia incrementada frente a las nucleasas.

Los términos "homología" o "porcentaje de identidad" se usan indistintamente en el presente documento. Para los fines de esta invención, se define en este documento que, a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con el fin de una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de un primer aminoácido o un ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o de nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones solapantes) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

Una comparación de las secuencias se puede llevar a cabo sobre la totalidad de las longitudes de las dos secuencias que se comparan o sobre un fragmento de las dos secuencias. Normalmente, la comparación se llevará a cabo sobre la longitud completa de las dos secuencias que se comparan. Sin embargo, la identidad de secuencia se puede llevar a cabo sobre una región, por ejemplo, de veinte, cincuenta, cien o más residuos de aminoácidos contiguos.

La persona experta será consciente del hecho de que diversos programas informáticos diferentes están disponibles para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias, se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de programas informáticos Accelrys GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), utilizando ya sea una matriz Blosom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La persona experta apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje global de identidad de dos secuencias no se altera significativamente cuando se utilizan diferentes algoritmos.

Las secuencias de proteínas o las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden utilizar adicionalmente como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas BLASTN y BLASTP (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST, tal y como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTP y BLASTN) se pueden utilizar. Véase la página de inicio del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

La invención proporciona además una estructura artificial de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de los aminoácidos

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una o varias propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa (tal como el polipéptido de SEQ ID NO: 2) y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, en donde dicha secuencia de ácido nucleico está ligada funcionalmente a una o varias secuencias de control capaces de dirigir la expresión de una lactasa en una célula hospedadora con expresión adecuada.

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido variante de lactasa de la invención.

Tal como se utiliza en este documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces

de una replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados funcionalmente. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante, están frecuentemente en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente en este documento, ya que el plásmido es la forma de vector utilizada más comúnmente. Sin embargo, la invención se entiende que incluye otras formas de vectores de expresión de este tipo, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o varias secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras que se utilizarán para la expresión, que están ligadas funcionalmente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "ligado funcionalmente" se entiende que significa que la secuencia de nucleótidos de interés está ligada a la o las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). La expresión "secuencia reguladora" se entiende que incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en una cierta célula hospedadora (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células hospedadoras para producir de este modo proteínas o péptidos, codificados por ácidos nucleicos como se describe en este documento (por ejemplo, una variante de lactasa de SEQ ID NO: 2, por ejemplo, un equivalente funcional o un fragmento, o una proteína de fusión que comprende una o varias de tales variantes).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden diseñar para expresar proteínas variantes de la invención en células procariontas o eucariotas.

Los vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores obtenidos a partir de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores obtenidos a partir de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episoma de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de seudorrabia y retrovirus, y vectores obtenidos a partir de combinaciones de los mismos, tales como los obtenidos a partir de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos.

El inserto de ADN debe estar ligado funcionalmente a un promotor apropiado. Se prefieren los promotores que son capaces de dirigir un nivel de expresión alto de la lactasa en los hongos filamentosos. Tales promotores son conocidos en la técnica. Las estructuras artificiales de expresión pueden contener sitios para la iniciación de la transcripción, la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por las estructuras artificiales incluirá un codón de iniciación de la traducción AUG al comienzo y un codón de terminación situado apropiadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

El ADN del vector se puede introducir en células procariontas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se utiliza en este documento, los términos "transformación" y "transfección" se entienden que se refieren a una variedad de métodos reconocidos en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora.

Los vectores preferidos para uso en bacterias se describen por ejemplo en el documento WO-A1-2004/074468. Otros vectores adecuados serán obvios para el experto en la materia.

Los promotores bacterianos conocidos, adecuados para uso en la presente invención incluyen los promotores descritos en el documento WO-A1-2004/074468.

Una variante de la invención se puede expresar de una forma tal que puede incluir regiones funcionales heterólogas adicionales, por ejemplo, señales de secreción. Una variante de la invención también puede comprender, por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, añadidos al extremo N-terminal del polipéptido, por ejemplo, para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula hospedadora, durante la purificación o durante la posterior manipulación y almacenamiento. Además, se pueden añadir restos peptídicos a una variante de la invención para facilitar la purificación, por ejemplo, mediante la adición de residuos de histidina o un marcador T7.

Las variantes de la invención, tales como proteínas de la presente invención o equivalentes funcionales de las mismas, por ejemplo, porciones biológicamente activas y fragmentos de las mismas, se pueden ligar funcionalmente a un polipéptido no variante (por ejemplo, secuencias de aminoácidos heterólogas) para formar proteínas de fusión. Un "polipéptido no variante" en este contexto se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga a una lactasa variante de la invención.

Dentro de una proteína de fusión, la variante de la invención se puede corresponder con una secuencia de longitud completa o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de la invención. Una proteína de fusión puede comprender al menos dos porciones biológicamente activas. Dentro de la proteína de fusión, la expresión "ligado funcionalmente" se entiende que indica que el polipéptido variante y el polipéptido no variante están fusionados en marco entre sí. El polipéptido no variante se puede fusionar con el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido variante.

La expresión y la secreción de una lactasa variante se pueden mejorar mediante la expresión de la variante en forma de una proteína de fusión. En este contexto, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión que comprende lactasa. Más específicamente, la pareja de la fusión puede ser glucoamilasa o un fragmento de la misma. La lactasa o una proteína de fusión de la misma, se puede secretar a través de la membrana de la célula hospedadora.

Una secuencia señal se puede utilizar para facilitar la secreción y el aislamiento de una variante de la invención. Una proteína de fusión se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante convencionales.

El experto en la materia reconocerá que se pueden introducir cambios mediante mutación en las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención, lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante sin alterar sustancialmente la función de una proteína de este tipo.

Por consiguiente, una variante de lactasa de la invención es preferiblemente una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a SEQ ID NO: 2, y que normalmente también conserva al menos una actividad funcional del polipéptido de referencia. Las variantes de la invención también se pueden identificar, por ejemplo, mediante el escrutinio de bancos combinatorios de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncamiento, de la proteína de la invención para estudiar la actividad de la lactasa. Un banco diversificado de variantes se puede generar mediante mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico. Un banco diversificado de variantes se puede producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas, de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias de proteínas potenciales se puede expresar como polipéptidos individuales o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la presentación en fagos). Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir bancos de variantes potenciales de los polipéptidos de la invención a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Las variantes de una enzima lactasa de referencia dada se pueden obtener mediante el siguiente procedimiento estándar:

- Mutagénesis (propensa a hacer errores, dopada con oligo, con inclusión de oligo) o síntesis de variantes
- Transformación, por ejemplo, en *E. coli* o *K. lactis*
- Cultivo de transformantes, selección de transformantes
- Expresión
- Purificación opcional y concentración
- Escrutinio primario
- Identificación de una variante mejorada (por ejemplo, en relación con una actividad específica)

En una realización, la invención se refiere a un método para producir una variante de polipéptido de lactasa de acuerdo con la invención, método que comprende:

- a) la selección de un polipéptido de lactasa de referencia;
- b) la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de 233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2;

- c) la sustitución opcional de uno o varios aminoácidos tal como se define en b);
- d) la preparación de la variante que resulta de las etapas a)-c);
- e) la determinación de una propiedad de la variante, por ejemplo, tal como se expone en los Ejemplos; y
- f) la selección de una variante que tiene una propiedad alterada en comparación con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 y la selección de una variante que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, con lo que se produce una variante de polipéptido de lactasa.

En una realización preferida en el método de producción de una variante de polipéptido de lactasa de acuerdo con la invención, el polipéptido de lactasa de referencia tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2.

Más preferiblemente, en la etapa b) del método de acuerdo con la invención, al menos un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de

233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004

está sustituido, estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2. El polipéptido de referencia puede tener al menos aproximadamente 80% de homología con SEQ ID NO: 2.

En otra realización, la invención presenta células, por ejemplo, células hospedadoras transformadas o células hospedadoras recombinantes que contienen un ácido nucleico incluido en la invención. Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la que (o en un antecesor de la misma) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Tanto las células procariontas como eucariotas están incluidas, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras y similares, especialmente preferidas son las células procedentes de levadura, por ejemplo, *K. lactis*. Las células hospedadoras también incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de mamífero tales como CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y líneas celulares del plexo coroideo.

Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son especies bacterianas gram positivas, tales como *Bacillaceae* que incluye *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*, especies de *Streptomyces* tales como *Streptomyces murinus*, especies bacterianas de ácido láctico que incluyen *Lactococcus* spp. tales como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp. que incluyen *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc* spp. y *Streptococcus* spp. Alternativamente, las cepas de una especie bacteriana gram negativa, tales como especies que pertenecen a *Enterobacteriaceae*, incluyendo *E. coli* o a *Pseudomonadaceae*, se pueden seleccionar como organismo hospedador.

Un organismo hospedador de levadura adecuado se puede seleccionar ventajosamente a partir de una especie de *Saccharomyces* que incluye *Saccharomyces cerevisiae* o una especie que pertenece a *Schizosaccharomyces*. Además, organismos hospedadores de levadura útiles incluyen *Pichia* spp., tales como las especies metilotróficas del presente documento, que incluyen *Pichia pastoris*, y *Kluyveromyces* spp. que incluyen *Kluyveromyces lactis*.

Los organismos hospedadores adecuados entre los hongos filamentosos incluyen especies de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyocladium* o *Trichoderma*, tales como por ejemplo, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus niger*, que incluye *Aspergillus nigervar. awamori*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cereals*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola langinosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizomucor miehei*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesii* o *Trichoderma viride*.

Una célula hospedadora se puede seleccionar de modo que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto codificado por la secuencia de ácido nucleico incorporado en una forma específica, deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y el procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden facilitar un funcionamiento óptimo de la proteína codificada.

Diversas células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para un procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados que son conocidos por los expertos en la técnica de la biología molecular y/o la microbiología, se pueden elegir para asegurar la modificación deseada y correcta y el procesamiento de la proteína extraña expresada. Con esta finalidad, las células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para un procesamiento apropiado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico, se pueden utilizar. Tales células hospedadoras son bien conocidas en la técnica.

Si se desea, una línea celular transfectada de forma estable puede producir una variante de acuerdo con la invención. Una variedad de vectores adecuados para una transfección estable de células de mamífero están disponibles al público, también se conocen públicamente métodos para construir tales líneas celulares, por ejemplo, en Ausubel et al. (supra).

5 La presente invención da a conocer además una composición que comprende las variantes de lactasa de acuerdo con la invención. La invención proporciona de este modo una composición que comprende el polipéptido variante tal como se describe en el presente documento y al menos un componente seleccionado a partir de sales (como sodio o cloruro de potasio), un conservante, un poliol (como glicerol), iones metálicos (tales como iones de magnesio o de manganeso).

10 La composición puede comprender opcionalmente otros ingredientes tales como, por ejemplo, otras enzimas. Una composición de este tipo puede comprender el polipéptido variante de la invención o uno obtenible por un método de la invención para la identificación de una lactasa variante.

Además de la lactasa variante, y una o varias enzimas adicionales, si están presentes, una composición de acuerdo con la invención puede comprender aditivos que se usan convencionalmente en preparaciones de lactasa, como por ejemplo KCl o glicerol.

15 La invención se refiere además al uso de un polipéptido variante de la invención o de una composición de la invención en la preparación de un producto lácteo.

La invención también se refiere a un procedimiento para la producción de un producto lácteo, método que comprende añadir una cantidad eficaz de un polipéptido variante o una composición de la invención a la leche y permitir que el polipéptido variante ejerza su actividad enzimática.

20 Tal y como se usa en este documento, un producto lácteo incluye cualquier composición que se produce a partir de la leche, por ejemplo, caseína y/o proteína de suero. Ejemplos son leche, productos derivados de la leche, productos lácteos fermentados (por ejemplo, yogur), leche condensada, leche UHT, leche evaporada, leche en polvo, leche congelada, helados, crema, mantequilla, leche agria, suero de leche; y/o queso. El producto también puede ser un producto hidrolizado o un producto obtenido mediante el fraccionamiento de la leche o suero de la leche, como caseinato, concentrado de proteína láctea, concentrado de proteína de suero de leche (WPC), aislado de proteína de suero de leche (WPI) o permeado de suero de leche (concentrado) y productos preparados a partir de los mismos

La leche se obtiene, por ejemplo, a partir de vacas, búfalos, cabras, ovejas, camellos, burros, caballos, renos, alces o yaks.

30 Una referencia en este documento realizada para un documento de patente o de otra materia que se proporciona como técnica anterior, no debe tomarse como una admisión de que ese documento o materia era conocida o que la información que contiene formaba parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

35 La invención se aclarará ahora haciendo referencia a los siguientes ejemplos, sin embargo, sin limitarla a los mismos.

Ejemplos

Materiales y métodos generales

Técnicas moleculares y genéticas

40 Los métodos convencionales de genética y biología molecular son conocidos en la técnica (por ejemplo, Maniatis et al. "*Molecular cloning: a laboratory manual*" (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Miller "*Experiments in molecular genetics*" (1972) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Sambrook y Russell "*Molecular cloning: a laboratory manual*" (3ª edición) (2001) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel "*Current protocols in molecular biology*" (1987) Green Publishing and Wiley Interscience, New York).

45 Cepas y plásmidos

pBAD/HisA se obtuvo a partir de Invitrogen® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). La cepa carente de beta-galactosidasa de *Escherichia coli*, BW25113 ($\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrmB-3)$, λ' , *rph-1*, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, *hsdR514*) (Datsenko KA, Wanner BL (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640-6645) se utilizó para la expresión de las variantes de beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

50 Medios

Medio 2xPY (16 g/l de peptona de peptona de BD BBL® Phytone®, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl) se utilizó para el crecimiento de *Escherichia coli*. Los antibióticos (100 microgramos/ml de ampicilina) se adjuntaron

para conservar los plásmidos. Para la inducción de la expresión génica se utilizó L-arabinosa con 0,02% de concentración final.

Ejemplo 1: Estructuras artificiales de ADN y transformación

5 Las estructuras artificiales de ADN sintético se diseñaron para que comenzaran con un sitio de restricción *Bbsl*, lo que daba como resultado en extremo saliente compatible con *NcoII* y que terminaba con un sitio de restricción *Bbsl* después del codón de parada, dando como resultado un extremo saliente compatible con *HindIII*. Los sitios de restricción internos *Bbsl* se eliminaron en el diseño de la estructura artificial de ADN sintético. A modo de ejemplo, un fragmento de ADN que codificaba la secuencia de beta-galactosidasa de tipo silvestre de *K. lactis* se muestra como SEQ ID NO: 1. Todas las variantes se diseñaron de una manera similar y se clonaron como fragmentos de *Bbsl* en los sitios de expresión *NcoII/HindIII* del vector pBAD/HisA.

15 Los cambios de aminoácidos que se introdujeron en las 14 variantes se presentan en la Tabla 2. La posición del cambio se indica en comparación con la secuencia de aminoácidos de beta-galactosidasa de tipo silvestre de *K. lactis* (SEQ ID NO: 2). Algunas variantes tienen múltiples cambios introducidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína beta-galactosidasa, como la variante nº 8 y nº 7. Un gen de tipo silvestre que codificaba la proteína beta-galactosidasa sin cambios, también se utilizó en la clonación de genes y la transformación y posteriormente se utilizó para comparar con las enzimas preparadas con los genes variantes.

Tabla 2: Cambios de aminoácidos introducidos en la secuencia proteica de beta-galactosidasa de *K. lactis*. Los aminoácidos se presentan de acuerdo con la abreviatura de una sola letra

Nº de variante	Mutaciones
1	T633G
2	Y440F
3	A483S
4	A1004P
5	A258T
6	D233V
7	N263S K274E N284S
8	D257G E297G
9	L862V
10	el V619
11	T415C
12	T415A
13	M622L
14	I621 V

20 La transformación de *E. coli* BW25113 se realizó utilizando el kit de transformación de *E. coli* Zymo Research Z-Competent® y el conjunto de tampones (T3001). Las cepas de *E. coli* transformadas se sembraron en placas con agar 2xPY que contenían 100 µg/ml de ampicilina, 0,02% de L-arabinosa y 40 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal), y se incubaron a 30°C durante la noche.

25 X-gal es un análogo de la lactosa y se hidroliza con la enzima β-galactosidasa. X-gal, cuando se escinde con la β-galactosidasa, produce galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último se dimeriza espontáneamente a continuación y se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, un producto de color azul intenso que es insoluble. Las placas se almacenaron a 4°C durante al menos 24 horas para permitir la formación del color azul después de la hidrólisis de X-gal. Como la cepa de *E. coli* de tipo silvestre BW25113 carece de actividad β-galactosidasa debido a la delección del operón lac, la formación del color azul confirmaba una expresión activa de la variante de β-galactosidasa seleccionada. De cada estructura artificial se sometieron a ensayo tres transformantes formadores de color azul para estudiar la producción de β-galactosidasa, utilizando un cultivo a pequeña escala en 24 pocillos (ejemplo 2), y se seleccionó el transformante mejor productor para una caracterización adicional de la enzima.

Ejemplo 2: Cultivo y preparación de muestras de enzima beta-galactosidasa

35 Los transformantes de *E. coli* BW25113 que expresaban un gen de la beta-galactosidasa variante, se replicaron desde las placas de agar en placas de 96 pocillos anchas (NUNC 267334, NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca) con 200 µl de 2*PY y 100 µg/ml de ampicilina, seguido por una incubación durante la noche a 30°C, 550 rpm y 80% de humedad en un agitador INFORS HT Microtron (Infors AG, Bottmingen, Suiza). Se utilizaron 15 µl de estos preculti-

vos para inocular placas de 24 pocillos (AXYGPDW10ML24CLIDS, Axygen[®], Corning, NY 14831 EE.UU.) que comprendían 3 ml de 2*PY con 100 µg/ml de ampicilina. Las placas de 24 pocillos se cubrieron con un sellado que permitía el paso de aire (6786051, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) y se incubaron a 30°C, 550 rpm y 80% de humedad en un agitador INFORS HT Microtron, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,6. Después, se añadió L-arabinosa hasta tener una concentración final de 0,02% y las placas de 24 pocillos se incubaron adicionalmente durante 20-24 horas a 20°C, 750 rpm y 80% de humedad en el agitador INFORS HT Microtron. Las placas de 24 pocillos se centrifugaron durante 10 minutos a 2750 rpm y 4°C y el material sobrenadante se separó de la placa por decantación. Los sedimentos celulares obtenidos se almacenaron a -20°C durante al menos 24 horas. Los sedimentos celulares congelados se resuspendieron en 1 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgSO₄ 0,2 mM, 2 mg/ml de lisozima, 0,1 mg/ml de ADNasa I, 1x mezcla de inhibidor de proteasa completa (sin EDTA, Roche)) mediante el uso de un vórtice, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido por centrifugación durante 10 minutos a 2750 rpm y 4°C. El material sobrenadante que comprendía la beta-galactosidasa sobreexpresada (extracto exento de células, CFE) se formuló mediante la adición de 1 volumen de glicerol y se empleó en los diferentes ensayos de la actividad.

15 **Ejemplo 3: Determinación de la cantidad de proteína lactasa**

Se determinó la cantidad de proteína lactasa producida por *E. coli*, usando HP-SEC (Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation). Para ello, se cargaron 2 µl de los extractos exentos de células (CFE) del Ejemplo 1 en un BEH200, sec 1,7 µm 4,6 X 150 mm de columna (Waters). La fase móvil consistía en 100 mM de tampón fosfato potásico (pH 7,32) y se mantuvo con un flujo de 0,1 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C, mientras que el flujo se fijó en 0,1 ml/min. La elución de la proteína se vigiló midiendo la absorbancia a 280 nm. Dado que la proteína lactasa es más grande que la mayoría de las demás proteínas en el CFE, fue el primer pico de proteína que eluyó de la columna en estas condiciones. El área bajo este pico se calculó y se cuantificó mediante una comparación con un patrón de albúmina de suero bovino (BSA). Los resultados de esta cuantificación se emplean para el cálculo de la actividad (específica) de las proteínas, tal y como se describe en los Ejemplos 4-7.

25 **Tabla 3A: Resultados del análisis de la actividad (específica) de las variantes en los diversos ensayos descritos en los Ejemplos 4-7. Los valores que son significativamente superiores ($p < 0,05$) o inferiores (% de inhibición) al promedio de las lactasas de tipo silvestre (6 muestras), están marcados**

Variante	Mutación	Actividad específica_NLU/mg de lactasa Ejemplo 4	Actividad específica LACU/mg de lactasa Ejemplo 5	Actividad específica LAGCU/mg de lactasa Ejemplo 6	% de inhibición Ejemplos 5 frente a 6	leche:mg de glucosa/mg de lactasa en 4 h Ejemplo 7	leche:mg/l de GOS después de 48 h Ejemplo 7
1 T633G		81	105	27	75	352	1209
2 Y440F		28	160	39	76	279	977
3 A483S		79	175	42	76	205	1494
4 A1004P		63	100	25	75	253	1062
5 A258T		66	98	29	71	305	1076
6 D233V		67	97	26	74	285	1026
7 N263S	K274E N284S	60	91	25	72	290	964
8 D257G	E297G	71	99	28	72	256	1201
9 L862V		73	100	27	73	258	1269
10 V619I		79	75	23	69	300	2050
11 T415C		98	147	35	77	179	1436
12 T415A		78	169	37	78	164	1341
13 M622L		78	43	16	62	186	1818
14 I621V		76	40	19	52	99	616
promedio tipo silvestre		67	103	28	73	206	1277
desv. est.		4	10	1	2	12	164

Tabla 3B: Resultados del análisis de la actividad (específica) de las variantes en los diversos ensayos descritos en los Ejemplos 4-7. Los valores de la Tabla 3A se expresan como valores relativos en comparación con los valores de la enzima de tipo silvestre en el mismo ensayo

Variante	Mutación		Actividad específica relativa NLU/mg de lactasa Ejemplo 4	Actividad específica relativa LACU/mg de lactasa Ejemplo 5	Actividad específica relativa LACGU/mg de lactasa Ejemplo 6	Inhibición relativa Ejemplos 5 frente a 6	Actividad relativa en la leche Ejemplo 7	Producción relativa de GOS en la leche Ejemplo 7	
1	T633G		120	102	97	102	171	95	
2	Y440F		42	155	140	104	135	77	
3	A483S		117	169	152	104	99	117	
4	A1004P		94	97	92	102	122	83	
5	A258T		98	95	104	97	148	84	
6	D233V		100	94	93	101	138	80	
7	N263S	K274E	N284S	90	88	92	99	141	75
8	D257G	E297G		106	96	100	99	124	94
9	L862V		109	96	98	100	125	99	
10	V619I		117	72	84	95	145	161	
11	T415C		146	143	125	105	86	112	
12	T415A		115	164	132	107	79	105	
13	M622L		117	41	59	85	90	142	
14	I621V		113	39	70	71	48	48	
promedio	tipo silvestre		100	100	100	100	100	100	
desv. est.			7	10	5	3	6	13	

Ejemplo 4: Determinación de la actividad sobre ONPG como sustrato

La determinación de la actividad utilizando o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato estaba esencialmente de acuerdo con el procedimiento descrito en el Food Chemical Codex (8ª edición de FCC, p1319-1320: Lactase (neutral) β -galactosidase activity).

Las muestras producidas en el Ejemplo 2 se diluyeron 200 veces hasta ~0,1 unidades de lactasa neutra (NLU) por ml, utilizando tampón A (fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5) que contiene EDTA 0,05 mM, MgSO₄ 0,1 mM y 0,2% (p/v) de Triton X100). El mismo tampón, pero sin Triton X100, se utiliza para la preparación del sustrato (50 mg de o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (Sigma-Aldrich) en 20 ml). Después de precalentar el sustrato, se mezcla lo siguiente: 125 μ l de sustrato y 25 μ l de muestra. La reacción se deja proceder durante 10 minutos a 37°C, después de lo cual la reacción se detiene mediante la adición de 25 μ l de carbonato de sodio (30 g/L) y 20 μ l de agua ultrapura. La absorbancia resultante a 405 nm se puede utilizar y comparar con la curva de calibración preparada a partir de o-nitrofenol (ONP). Las mediciones se produjeron en un analizador clínico Konelab (Thermo Scientific Arena 30). Se realizó un cálculo de la actividad como se describe en el Food Chemical Codex y se corrigió por la diferencia en la temperatura de ensayo. El factor de corrección era 1,25 y se estableció empíricamente. La actividad específica de las diferentes variantes de lactasa se determinó dividiendo estos valores por la dosificación de proteína (tal como se determina en el Ejemplo 3) en el ensayo y el resultado se expone en la Tabla 3.

Ejemplo 5: Determinación de la actividad sobre lactosa como sustrato

Las muestras se diluyeron hasta ~0,4 NLU/mL en tampón B (fosfato de sodio 100 mM (pH 6,5) que contenía EDTA 0,05 mM y MgSO₄ 1 mM). El sustrato consistía en 4,8% de lactosa monohidrato disuelta en tampón B. La mezcla de enzimas consistía en 780 unidades de peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich), 0,25 unidades de glucosa oxidasa (DSM) y 12,5 mg (+/- 1 mg) de sal de diamonio de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma Aldrich) en un total de 10 ml de tampón B. El ensayo se mide de forma relativa frente a una dilución en serie de la lactasa neutra (0,1-0,8 NLU/ml). Para que se produzca la reacción, lo siguiente se transfiere a un pocillo de una placa de microtitulación convencional: 25 μ l de tampón B, 25 μ l de muestra o patrón, 25 μ l de mezcla de

enzimas. Después de una preincubación durante 10 minutos, se añaden 175 µl de sustrato y la reacción se mide en un lector de MTP (Tecan Infinity M1000) a 420 nm y 30°C durante 30 minutos. La absorbancia se mide cada 30 segundos y la pendiente se calculó para cada cinco puntos de datos (2,5 minutos). La pendiente máxima durante el ensayo completo se utiliza para calcular la actividad. Esta pendiente máxima se expresa como µmol de glucosa producido por la lactasa por min en las condiciones descritas en este documento (LACU). La actividad específica de las diferentes variantes de lactasa se calcula dividiendo estos valores por la concentración de proteína en mg/ml (como se determina en el Ejemplo 3) en el ensayo. La actividad específica en LACU/mg de estas variantes de lactasa se expone en la Tabla 3. Una actividad específica elevada sobre la lactosa puede conducir a una dosificación menor de la enzima en posibles aplicaciones.

10 **Ejemplo 6: Determinación de la actividad en presencia de galactosa**

Las muestras se diluyeron hasta ~0,4 NLU/ml en tampón B. El sustrato consistía en 4,8% de lactosa monohidrato disuelta en tampón B. La mezcla de enzimas consistía en 780 unidades de peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich), 0,25 unidades de glucosa oxidasa (DSM) y 12,5 mg (+/- 1 mg) sal de diamonio de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS, Sigma Aldrich) en un total de 10 ml de tampón B. El tampón de inhibición C consistía en galactosa 1500 mM (pureza > 99,9%) en tampón B. El ensayo se mide de forma relativa frente a una dilución en serie de lactasa neutra (0,1 - 0,8 NLU/ml). Para que se produzca una reacción, se transfiere lo siguiente a un pocillo de una placa de microtitulación convencional: 25 µl de tampón C (excepto para los patrones), 25 µl de muestra o patrón, 25 µl de mezcla de enzimas. Después de preincubar durante 10 minutos, se añaden 175 µl de sustrato y la reacción se mide en un lector de MTP a 420 nm y 30°C durante 30 minutos. La absorbancia se mide cada 30 segundos y se calculó la pendiente para cada cinco puntos de datos. La pendiente máxima durante el ensayo completo se utiliza para calcular la actividad. Esta pendiente máxima se expresa como µmol de glucosa producido por la lactasa por min en las condiciones descritas en este documento (LACGU). La actividad específica en LACGU/mg de las diferentes variantes de lactasa se calcula dividiendo esos valores por la concentración de proteína en mg/ml (como se determina en el Ejemplo 3) en el ensayo y los resultados se muestran en la Tabla 3.

25 El porcentaje de inhibición mediante galactosa se calcula utilizando la fórmula

$$\% \text{ de inhibición} = 100 * (x - y) / x$$

en donde x representa la actividad específica en LACU/mg de lactasa como se describe en el Ejemplo 5, e y representa la actividad específica en LACGU/mg de lactasa como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados del cálculo del % de inhibición se muestran en la Tabla 3. Un % de inhibición bajo puede conducir a una mayor actividad en condiciones en la aplicación en donde la concentración de lactosa es baja y la concentración de galactosa es alta, cuando se requiere una concentración baja de lactosa residual.

30 **Ejemplo 7: Determinación de la actividad en la leche a temperatura baja**

Se mezcló 1 ml de leche UHT comercial semidesnatada (Campina) con 0,2 ml de enzima (~ 20 NLU/ml) tal como se producía en el Ejemplo 2, en placas de microtitulación con pocillos profundos. Las muestras se incubaron en condiciones estáticas durante 4, 24 o 48 horas a 6°C. Después de esta incubación, las reacciones finalizaron mediante un tratamiento térmico a 90°C durante 6 minutos, después de lo cual las muestras se colocaron directamente en un congelador a -20°C hasta su análisis. La preparación de muestras para RMN se realizó del modo siguiente: se añadieron 48 µl de HCl 4,0 M y las placas se sellaron y se mezclaron mediante inclinación. A continuación, las placas se agitaron durante 20 minutos a 600 rpm y posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 4750 rpm. A partir del material sobrenadante claro, 0,3 ml se transfirieron a una nueva placa y se combinaron con 0,2 ml de una solución que contenía 20 g/l de ácido maleico (patrón interno) y 40 g/l de EDTA en D₂O. Las placas se sellaron, se mezclaron mediante inclinación y se centrifugaron brevemente. Después de una liofilización, el residuo se disolvió en 0,05 ml de D₂O y se repitió la liofilización. El residuo seco se disolvió en 0,7 ml de D₂O, se liofilizó de nuevo durante la noche y se disolvió de nuevo en 0,7 ml de D₂O. Después de una mezcla cuidadosa, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4750 rpm y 0,6 ml se transfirieron a un tubo de RMN. Las muestras se midieron en un espectrómetro Bruker Avance III equipado con una criosonda que operaba a una frecuencia de protones de 700 MHz a una temperatura de la sonda de 290K. Las muestras se midieron en plegamiento sencillo usando 8 barridos y un retraso de 30 segundos. A partir de los espectros de RMN, los siguientes compuestos fueron cuantificados: lactosa (δ = 4,67 (d)), glucosa δ = 4,64 (d), galactosa δ = 4,58 (d) y galacto-oligosacárido (GOS, integral de la zona desde δ = 4,52 a aprox. δ = 4,38). En la Tabla 3 se indica la cantidad de glucosa detectada después de 4 horas de incubación por mg de enzima añadida. También se representa la cantidad de GOS después de 48 horas, cuando la mayoría de la lactosa se hidroliza y queda poca lactosa residual (<0,5 g/l).

Una actividad de hidrólisis de lactosa elevada de la enzima en la leche a temperatura baja (4-12°C) puede conducir a una dosificación reducida de la enzima en una aplicación de este tipo, relevante para la industria láctea y, por lo tanto, un coste reducido. Un aumento de la producción de GOS puede conducir a un efecto prebiótico de la leche producida.

55 **Ejemplo 8: Combinaciones de variantes de lactasa**

Se generaron diferentes combinaciones de mutaciones en el gen de la lactasa como se ha descrito en el Ejemplo 1,

excepto que los múltiples cambios de aminoácidos se combinaron en el producto de expresión de una estructura artificial génica. Las diferentes variantes que contienen estos cambios de aminoácidos combinados se exponen en la Tabla 4. La posición del cambio se indica en comparación con la secuencia de aminoácidos de la beta-galactosidasa de tipo silvestre de *K. lactis* (SEQ ID NO: 2).

5 Tabla 4: Cambios de aminoácidos introducidos en la secuencia proteica de la beta-galactosidasa de *K. lactis*. Los aminoácidos se indican de acuerdo con la abreviatura de una letra

Nº de variante	Mutaciones					
15	Y440F	V619I	T633G			
16	Y440F	V619I	A483S			
17	Y440F	V619I	T633G	A258T	A483S	
18	Y440F	V619I	T415A	A258T	A483S	
19	Y440F	V619I	T633G	L862V		
20	Y440F	V619I	T415A	L862V		
21	Y440F	V619I	T415C	L862V		
22	Y440F	V619I	A483S	L862V		
23	Y440F	T415A				
24	T415A	A483S				
25	T415C	A483S				
26	T633G	A483S				
27	Y440F	V619I	T415C			
28	V619I	A483S	T415A			
29	A258T	V619I	A483S	T415A		
30	A258T	V619I	T633G	T415A	A483S	
31	A258T	V619I	Y440F	E264V	A483S	
32	A258T	V619I	Y440F	L862V	E264V	A483S
33	L862V	V619I	T633G	T415A		
34	A483S	V619I	T415A	L862V		
35	A483S	V619I	T633G	L862V		
36	L862V	V619I	E264V	A483S		

10 Una vez más, los genes de lactasa modificados se expresaban en *E. coli* y se aisló la proteína lactasa como se ha descrito en el Ejemplo 2. La cantidad de proteína lactasa que se expresaba se determinó como se describe en el Ejemplo 3. La actividad de estas muestras de enzima sobre la hidrólisis de la lactosa se determinó tal como se ha descrito en el Ejemplo 5 y en comparación con la actividad de la enzima de tipo silvestre expresada y aislada de la misma manera. También se determinó la actividad de las muestras de enzima sobre la hidrólisis de la lactosa en la leche a baja temperatura después de 4 horas, como se ha descrito en el Ejemplo 7.

15 La actividad específica de las diferentes variantes de lactasa se calcula dividiendo los valores medidos por la concentración de proteína lactasa en mg/ml en el ensayo. La actividad específica de estas variantes de lactasa en ambos ensayos se expresaba como la actividad relativa en comparación con la actividad de la enzima de tipo silvestre obtenida en los mismos ensayos. Para ello, la actividad específica de la lactasa de tipo silvestre se fijó en 100 en ambos ensayos, y las actividades específicas calculadas de las variantes estaban relacionadas con esto. Los resultados de este análisis se representan en la Tabla 5.

20 Tabla 5: Resultados del análisis de la actividad (específica) de las variantes en los diversos ensayos. Los valores se representan con relación al valor encontrado con la lactasa de tipo silvestre. Los que son significativamente más altos ($p < 0,05$) del promedio de las lactasas de tipo silvestre, están marcados

ES 2 670 422 T3

Variante	Mutación						Actividad específica relativa sobre la lactosa Ejemplo 8	Actividad relativa en la leche Ejemplo 8
15	Y440F	V619I	T633G				47	139
16	Y440F	V619I	A483S				115	107
17	Y440F	V619I	T633G	A258T	A483S		144	162
18	Y440F	V619I	T415A	A258T	A483S		130	122
19	Y440F	V619I	T633G	L862V			46	118
20	Y440F	V619I	T415A	L862V			145	116
21	Y440F	V619I	T415C	L862V			135	114
22	Y440F	V619I	A483S	L862V			119	134
23	Y440F	T415A					138	74
24	T415A	A483S					167	33
25	T415C	A483S					142	61
26	T633G	A483S					133	65
27	Y440F	V619I	T415C				144	106
28	V619I	A483S	T415A				154	61
29	A258T	V619I	A483S	T415A			149	41
30	A258T	V619I	T633G	T415A	A483S		141	98
31	A258T	V619I	Y440F	E264V	A483S		135	100
32	A258T	V619I	Y440F	L862V	E264V	A483S	128	96
33	L862V	V619I	T633G	T415A			122	106
34	A483S	V619I	T415A	L862V			153	102
35	A483S	V619I	T633G	L862V			169	99
36	L862V	V619I	E264V	A483S			118	78
promedio	tipo silvestre						100	100
desv. est.							6	6

A partir de este análisis se puede deducir que diversas variantes de combinación muestran una hidrólisis de lactosa ventajosa en ambos ensayos.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> DSM IP Assets B.V.	
	<120> Variantes enzimáticas mejoradas	
	<130> 30115-WO-PCT	
5	<150> EP14151124.6 < 151> 2014-01-14	
	<150> EP14169816.7 < 151> 2014-05-26	
	<160> 2	
10	<170> BiSSAP 1.2	
	<210> 1 < 211> 3103 < 212> ADN < 213> Kluyveromyces lactis	
15	<220> < 221> fuente < 222> 1..3103 < 223> /organismo="Kluyveromyces lactis" /mol_type="ADN no asignado"	
	<400> 1	
	gaagaccaca tgtccttgcc tattcctgag aatttaagga accccaaaaa ggttcacgaa	60
	aatagattgc ctactagggc ttactactat gatcaggata ttttcgaatc tctcaatggg	120
	ccttgggctt ttgctgtgtt tgatgcacct cttgacgctc cggatgctaa gaatttagac	180
	tgggaaacgg caaagaaatg gagcaccatt tctgtgccat ccattggga acttcaggaa	240
	gattggaagt acggtaaacc aatttacacg aacgtacagt accctatccc aatcgacatc	300
	ccaaatcctc ccaactgtaa tcctactggg gtttatgcta gaacttttga attagattcg	360
	aatcgattg agtcgttcca gcacagattg agatttgagg gtgtggacia ttgttacgag	420
	ctttatgtta atgggtcaata tgtgggtttc aataaggggt cccgtaacgg ggctgaattt	480
	gatatccaaa agtacgtttc tgagggcgaa aacttagtgg tcgtcaaggt tttcaagtgg	540
	tccgattcca cttatatcga ggaccaagat caatgggtgc tctctggtat ttacagagac	600
	gtttctttac taaaattgcc taagaaggcc catattgaag atgttagggg cactacaact	660
	tttgtggact ctacgtatca ggatgcagag ctttctgtga aagttgatgt ccagggttct	720
	tcttatgatc acatcaattt cacactttac gaacctgaag atggatctaa agtttacgat	780
	gcaagctcct tgttgaaacga ggagaatggg aacacgactt tttcaactaa agaatttatt	840
	tccttctcca ccaaaaagaa cgaagaaaca gctttcaaga tcaacgtcaa ggccccagaa	900
	cattggaccg cagaaaatcc tactttgtac aagtaccagt tggatttaat tggatctgat	960
	ggcagtgatg ttcaatctat taagccat gttggtttca gacaagtgga gttgaaggac	1020

ES 2 670 422 T3

ggtaacatta ctgttaatgg caaagacatt ctctttagag gtgtcaacag acatgatcac 1080
 catccaaggt tccgtagagc tgtgccatta gattttgttg ttagggactt gattctaagt 1140
 aagaagtta acatcaatgc tgttcgtaac tccgattatc caaacatcc taaggtgtat 1200
 gacctcttcg ataagctggg cttctgggtc attgacgagg cagatcttga aactcatggt 1260
 gttcaagagc catttaatcg tcatacgaac ttggaggctg aatatccaga tactaaaaat 1320
 aaactctacg atgttaatgc ccattactta tcagataatc cagagtacga ggtcgcgtac 1380
 ttagacagag cttcccaact tgtcctaaga gatgtcaatc atccttcgat tattatctgg 1440
 tccttgggta acgaagcttg ttatggcaga aaccacaaag ccatgtacaa gtttaattaa 1500
 caattggatc ctaccagact tgtgcattat gagggtgact tgaacgcttt gagtgcagat 1560
 atctttagtt tcatgtaccc aacatttgaa attatggaaa ggtggaggaa gaaccacact 1620
 gatgaaaatg gtaagtttga aaagcctttg atcttgtgtg agtacggcca tgcaatgggt 1680
 aacggtcctg gctccttgaa agaatatcaa gagttgttct acaaggagaa gttttacca 1740
 ggtggcctta tctgggaatg ggcaaatcac ggtattgaat tcgaagatgt tagtactgca 1800
 gatgtaagt tgcataaagc ttatgcttat ggtggtgact ttaaggaaga ggttcatgac 1860
 ggagtgttca tcatggatgg tttgtgtaac agtgagcata atcctactcc gggccttgta 1920
 gagtataaga aggttattga acccgttcat attaaaattg cgcacggatc tgtaacaatc 1980
 acaataaagc acgacttcat tacgacagac cacttattgt ttatcgaca ggacacggga 2040
 aagacaatcg acgttccatc tttaaagcca gaagaatctg ttactattcc ttctgataca 2100
 acttatgttg ttgccgtgtt gaaagatgat gctggtgttc taaaggcagg tcatgaaatt 2160
 gcctggggcc aagctgaact tccattgaag gtacccgatt ttgttacaga gacagcagaa 2220
 aaagctgcga agatcaacga cggtaaactg tatgtctcag ttgaatccag tggattgcat 2280
 tttatcttgg acaaatgttt gggtaaaatt gaaagcctaa aggtcaaggg taaggaaatt 2340
 tccagcaagt ttgagggttc ttcaatcact ttctggagac ctccaacgaa taatgatgaa 2400
 cctagggact ttaagaactg gaagaagtac aatattgatt taatgaagca aaacatccat 2460
 ggagtgagtg tcgaaaaagg ttctaattgt tctctagctg tagtcacggg taactctcgt 2520
 atatccccag ttgtatttta ctatgggttt gagactgttc agaagtacac gatctttgct 2580
 acaaaaaata acttgaacac ttctatgaag cttactggcg aatatcagcc tcctgatttc 2640
 ccaagagttg ggtacgaatt ctggctagga gatagttatg aatcatttga atggttaggt 2700
 cgcgggcccc gcgaatcata tccggataag aaggaatctc aaagattcgg tctttacgat 2760
 tccaaagatg tagaggaatt cgtatatgac taccctcaag aaaatggaaa tcatacagat 2820
 acccactttt tgaacatcaa atttgaaggt gcaggaaaac tatcgatctt ccaaaaggag 2880
 aagccattta acttcaagat ttcagacgaa tacggggttg atgaagctgc ccacgcttgt 2940
 gacgttaaaa gatacggcag acactatcta aggttgacc atgcaatcca tgggtgtggt 3000
 agcgaagcat gcggacctgc tgttctggac cagtacagat tgaaagctca agatttcaac 3060
 tttgagtttg atctcgtttt tgaataaagg aagcttagtc ttc 3103

<210> 2
 <211> 1025
 <212> PRT
 <213> Kluyveromyces lactis

ES 2 670 422 T3

<400> 2

Met Ser Cys Leu Ile Pro Glu Asn Leu Arg Asn Pro Lys Lys Val His
 1 5 10 15
 Glu Asn Arg Leu Pro Thr Arg Ala Tyr Tyr Tyr Asp Gln Asp Ile Phe
 20 25 30
 Glu Ser Leu Asn Gly Pro Trp Ala Phe Ala Leu Phe Asp Ala Pro Leu
 35 40 45
 Asp Ala Pro Asp Ala Lys Asn Leu Asp Trp Glu Thr Ala Lys Lys Trp
 50 55 60
 Ser Thr Ile Ser Val Pro Ser His Trp Glu Leu Gln Glu Asp Trp Lys
 65 70 75 80
 Tyr Gly Lys Pro Ile Tyr Thr Asn Val Gln Tyr Pro Ile Pro Ile Asp
 85 90 95
 Ile Pro Asn Pro Pro Thr Val Asn Pro Thr Gly Val Tyr Ala Arg Thr
 100 105 110
 Phe Glu Leu Asp Ser Lys Ser Ile Glu Ser Phe Glu His Arg Leu Arg
 115 120 125
 Phe Glu Gly Val Asp Asn Cys Tyr Glu Leu Tyr Val Asn Gly Gln Tyr
 130 135 140
 Val Gly Phe Asn Lys Gly Ser Arg Asn Gly Ala Glu Phe Asp Ile Gln
 145 150 155 160
 Lys Tyr Val Ser Glu Gly Glu Asn Leu Val Val Val Lys Val Phe Lys
 165 170 175
 Trp Ser Asp Ser Thr Tyr Ile Glu Asp Gln Asp Gln Trp Trp Leu Ser
 180 185 190
 Gly Ile Tyr Arg Asp Val Ser Leu Leu Lys Leu Pro Lys Lys Ala His
 195 200 205
 Ile Glu Asp Val Arg Val Thr Thr Phe Val Asp Ser Gln Tyr Gln
 210 215 220
 Asp Ala Glu Leu Ser Val Lys Val Asp Val Gln Gly Ser Ser Tyr Asp
 225 230 235 240
 His Ile Asn Phe Thr Leu Tyr Glu Pro Glu Asp Gly Ser Lys Val Tyr
 245 250 255
 Asp Ala Ser Ser Leu Leu Asn Glu Glu Asn Gly Asn Thr Thr Phe Ser
 260 265 270
 Thr Lys Glu Phe Ile Ser Phe Ser Thr Lys Lys Asn Glu Glu Thr Ala
 275 280 285
 Phe Lys Ile Asn Val Lys Ala Pro Glu His Trp Thr Ala Glu Asn Pro
 290 295 300
 Thr Leu Tyr Lys Tyr Gln Leu Asp Leu Ile Gly Ser Asp Gly Ser Val
 305 310 315 320
 Ile Gln Ser Ile Lys His His Val Gly Phe Arg Gln Val Glu Leu Lys
 325 330 335
 Asp Gly Asn Ile Thr Val Asn Gly Lys Asp Ile Leu Phe Arg Gly Val
 340 345 350
 Asn Arg His Asp His His Pro Arg Phe Gly Arg Ala Val Pro Leu Asp
 355 360 365
 Phe Val Val Arg Asp Leu Ile Leu Met Lys Lys Phe Asn Ile Asn Ala

ES 2 670 422 T3

370						375						380					
Val	Arg	Asn	Ser	His	Tyr	Pro	Asn	His	Pro	Lys	Val	Tyr	Asp	Leu	Phe		
385					390					395					400		
Asp	Lys	Leu	Gly	Phe	Trp	Val	Ile	Asp	Glu	Ala	Asp	Leu	Glu	Thr	His		
				405					410					415			
Gly	Val	Gln	Glu	Pro	Phe	Asn	Arg	His	Thr	Asn	Leu	Glu	Ala	Glu	Tyr		
			420					425						430			
Pro	Asp	Thr	Lys	Asn	Lys	Leu	Tyr	Asp	Val	Asn	Ala	His	Tyr	Leu	Ser		
		435					440					445					
Asp	Asn	Pro	Glu	Tyr	Glu	Val	Ala	Tyr	Leu	Asp	Arg	Ala	Ser	Gln	Leu		
		450				455					460						
Val	Leu	Arg	Asp	Val	Asn	His	Pro	Ser	Ile	Ile	Ile	Trp	Ser	Leu	Gly		
465					470					475					480		
Asn	Glu	Ala	Cys	Tyr	Gly	Arg	Asn	His	Lys	Ala	Met	Tyr	Lys	Leu	Ile		
				485					490						495		
Lys	Gln	Leu	Asp	Pro	Thr	Arg	Leu	Val	His	Tyr	Glu	Gly	Asp	Leu	Asn		
			500					505					510				
Ala	Leu	Ser	Ala	Asp	Ile	Phe	Ser	Phe	Met	Tyr	Pro	Thr	Phe	Glu	Ile		
		515					520					525					
Met	Glu	Arg	Trp	Arg	Lys	Asn	His	Thr	Asp	Glu	Asn	Gly	Lys	Phe	Glu		
		530				535					540						
Lys	Pro	Leu	Ile	Leu	Cys	Glu	Tyr	Gly	His	Ala	Met	Gly	Asn	Gly	Pro		
545					550					555					560		
Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Tyr	Gln	Glu	Leu	Phe	Tyr	Lys	Glu	Lys	Phe	Tyr		
				565					570						575		
Gln	Gly	Gly	Phe	Ile	Trp	Glu	Trp	Ala	Asn	His	Gly	Ile	Glu	Phe	Glu		
			580					585						590			
Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Asp	Gly	Lys	Leu	His	Lys	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Gly		
		595				600						605					
Gly	Asp	Phe	Lys	Glu	Glu	Val	His	Asp	Gly	Val	Phe	Ile	Met	Asp	Gly		
		610				615					620						
Leu	Cys	Asn	Ser	Glu	His	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Leu	Val	Glu	Tyr	Lys		
625					630					635					640		
Lys	Val	Ile	Glu	Pro	Val	His	Ile	Lys	Ile	Ala	His	Gly	Ser	Val	Thr		
				645				650						655			
Ile	Thr	Asn	Lys	His	Asp	Phe	Ile	Thr	Thr	Asp	His	Leu	Leu	Phe	Ile		
			660					665						670			
Asp	Lys	Asp	Thr	Gly	Lys	Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu		
		675					680							685			
Glu	Ser	Val	Thr	Ile	Pro	Ser	Asp	Thr	Thr	Tyr	Val	Val	Ala	Val	Leu		
		690				695					700						
Lys	Asp	Asp	Ala	Gly	Val	Leu	Lys	Ala	Gly	His	Glu	Ile	Ala	Trp	Gly		
705					710					715					720		
Gln	Ala	Glu	Leu	Pro	Leu	Lys	Val	Pro	Asp	Phe	Val	Thr	Glu	Thr	Ala		
				725					730						735		
Glu	Lys	Ala	Ala	Lys	Ile	Asn	Asp	Gly	Lys	Arg	Tyr	Val	Ser	Val	Glu		
				740				745						750			
Ser	Ser	Gly	Leu	His	Phe	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	Leu	Gly	Lys	Ile	Glu		
		755					760					765					
Ser	Leu	Lys	Val	Lys	Gly	Lys	Glu	Ile	Ser	Ser	Lys	Phe	Glu	Gly	Ser		
		770				775					780						
Ser	Ile	Thr	Phe	Trp	Arg	Pro	Pro	Thr	Asn	Asn	Asp	Glu	Pro	Arg	Asp		
785					790					795					800		
Phe	Lys	Asn	Trp	Lys	Lys	Tyr	Asn	Ile	Asp	Leu	Met	Lys	Gln	Asn	Ile		
				805					810						815		
His	Gly	Val	Ser	Val	Glu	Lys	Gly	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Val		
				820					825					830			
Thr	Val	Asn	Ser	Arg	Ile	Ser	Pro	Val	Val	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Glu		
				835				840						845			
Thr	Val	Gln	Lys	Tyr	Thr	Ile	Phe	Ala	Asn	Lys	Ile	Asn	Leu	Asn	Thr		
				850		855					860						
Ser	Met	Lys	Leu	Thr	Gly	Glu	Tyr	Gln	Pro	Pro	Asp	Phe	Pro	Arg	Val		
865					870					875					880		

ES 2 670 422 T3

Gly Tyr Glu Phe Trp Leu Gly Asp Ser Tyr Glu Ser Phe Glu Trp Leu
 885 890 895
 Gly Arg Gly Pro Gly Glu Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Glu Ser Gln Arg
 900 910
 Phe Gly Leu Tyr Asp Ser Lys Asp Val Glu Glu Phe Val Tyr Asp Tyr
 915 920 925
 Pro Gln Glu Asn Gly Asn His Thr Asp Thr His Phe Leu Asn Ile Lys
 930 935 940
 Phe Glu Gly Ala Gly Lys Leu Ser Ile Phe Gln Lys Glu Lys Pro Phe
 945 950 960
 Asn Phe Lys Ile Ser Asp Glu Tyr Gly Val Asp Glu Ala Ala His Ala
 965 970 975
 Cys Asp Val Lys Arg Tyr Gly Arg His Tyr Leu Arg Leu Asp His Ala
 980 985 990
 Ile His Gly Val Gly Ser Glu Ala Cys Gly Pro Ala Val Leu Asp Gln
 995 1000 1005
 Tyr Arg Leu Lys Ala Gln Asp Phe Asn Phe Glu Phe Asp Leu Ala Phe
 1010 1015 1020
 Glu
 1025

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido variante que tiene actividad de lactasa, en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos
- 5 233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004
- estando definidas dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 2 y en donde la variante tiene una o varias propiedades alteradas en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa y en donde dicha variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.
- 10 2. Un polipéptido variante según la reivindicación 1, en donde el polipéptido de referencia es la lactasa de SEQ ID NO: 2.
3. Un polipéptido variante según la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido variante es un polipéptido de origen no natural.
- 15 4. Un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la variante muestra una actividad específica incrementada sobre ONPG en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa.
5. Un polipéptido variante según la reivindicación 4, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 415, 483, 619, 621, 622 o 633.
- 20 6. Un polipéptido variante según la reivindicación 4 o 5, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de T415C, T415A, A483S, V619I, I621V, M622L o T633G.
7. Un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la variante muestra una actividad específica incrementada sobre la lactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa.
- 25 8. Un polipéptido variante según la reivindicación 7, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 415, 440 o 483.
- 30 9. Un polipéptido variante según la reivindicación 7 u 8, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de T415C, T415A, Y440F o A483S.
10. Un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la variante muestra una actividad incrementada sobre la lactosa en la leche, en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa.
- 35 11. Un polipéptido variante según la reivindicación 10, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 440, 619, 633, 862 o 1004.
- 40 12. Un polipéptido variante según la reivindicación 10 u 11, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de D233V, D257G, A258T, N263S, K274E, N284S, E297G, Y440F, V619I, T633G, L862V o A1004P.
13. Un polipéptido variante según la reivindicación 10 u 11 o 12, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos dos sustituciones seleccionadas a partir de N263S, K274E o N284S.
- 45 14. Un polipéptido variante según la reivindicación 10 u 11 o 12, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos las sustituciones D257G y E297G.
15. Un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la variante muestra una disminución de la inhibición con galactosa en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa.
- 50 16. Un polipéptido variante según la reivindicación 15, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de ami-

noácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 619, 621 o 622.

17. Un polipéptido variante según la reivindicación 15 o 16, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de V619I, I621V o M622L.

5 18. Un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la variante muestra un aumento de la producción de GOS en la leche, en comparación con un polipéptido de referencia que tiene actividad de lactasa.

10 19. Un polipéptido variante según la reivindicación 18, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución de un residuo de aminoácido correspondiente a cualquiera de los aminoácidos 619 o 622.

20. Un polipéptido variante según la reivindicación 18 o 19, que comprende una secuencia de aminoácidos que cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, comprende al menos una sustitución seleccionada a partir de V619I o M622L.

15 21. Un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende sustituciones adicionales distintas de las definidas en la reivindicación 1.

22. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

20 23. Una estructura artificial de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 22, ligada funcionalmente a una o varias secuencias de control capaces de dirigir la expresión de una lactasa en un hospedador de expresión adecuada.

24. Un vector de expresión recombinante que comprende la estructura artificial de ácido nucleico según la reivindicación 23.

25. Una célula hospedadora recombinante que comprende el vector de expresión según la reivindicación 24.

25 26. Un método para producir una lactasa que comprende cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 25, en condiciones que conducen a una producción de la lactasa y recuperación de la lactasa.

27. Un método para producir una variante de polipéptido de lactasa, método que comprende:

(a) la selección de un polipéptido que tiene actividad de lactasa;

30 (b) la sustitución de al menos un residuo de aminoácido que se corresponde con cualquiera de 233, 257, 258, 263, 274, 284, 297, 415, 440, 483, 619, 621, 622, 633, 862 o 1004, estando definida dicha posición con referencia a SEQ ID NO: 2;

(c) la sustitución opcional de uno o varios aminoácidos adicionales, tal como se define en (b);

(d) la preparación de la variante que resulta de las etapas (a)-(c);

(e) la determinación de una propiedad de la variante;

35 (f) la selección de una variante que tiene una propiedad alterada en comparación con la lactasa que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 y la selección de una variante que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, para producir de este modo una variante de polipéptido de lactasa.

28. Una composición que comprende el polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 o que se puede obtener mediante un método según la reivindicación 27, y al menos un componente seleccionado a partir de una sal, un conservante, un poliol o iones metálicos.

40 29. Uso de un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 o de una composición según la reivindicación 28, en la preparación de un producto lácteo con poco contenido en lactosa o sin lactosa.

30. Un procedimiento para la producción de un producto lácteo, método que comprende añadir una cantidad eficaz de un polipéptido variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 o de una composición según la reivindicación 28, a un producto lácteo y permitir que el polipéptido ejerza su actividad enzimática.