

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 742**

51 Int. Cl.:

C12N 15/81 (2006.01)

C07K 14/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2014** **PCT/EP2014/076291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015** **WO15082488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2014** **E 14843223 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 3077517**

54 Título: **Proteína estructuradora del hielo**

30 Prioridad:

02.12.2013 EP 13195351

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

01.04.2019

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon, 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

JONG, DE, RENÉ MARCEL y

DEKKER, PETRUS JACOBUS THEODORUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 706 742 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

Proteína estructuradora del hielo.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una célula huésped fúngica filamentosa que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un constructo de ácido nucleico, en el que dicho constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína estructuradora del hielo (en inglés, ISP). La invención se refiere además a un método para la producción de una ISP, a una ISP, a una composición alimenticia que comprende dichas ISP, a un método para la preparación de una composición alimenticia que usa las ISP y al uso de las ISP en una composición alimenticia.

Antecedentes de la invención

Un grupo interesante de proteínas que tiene potencialmente muchas posibilidades de aplicación es las proteínas estructuradoras del hielo (ISP), a menudo denominadas como proteínas anticongelantes (AFP).

Warren *et al.* (documento US5118792) han sugerido añadir ISP purificadas directamente a los productos alimenticios antes de la congelación para mejorar las características de conservación durante el almacenamiento congelado. El documento WO90/13571 A1 enseña métodos de mejora de la tolerancia a la congelación de productos alimenticios suprimiendo el crecimiento de cristales de hielo o inhibiendo la recristalización del hielo usando polipéptidos anticongelantes en forma aislada. Una amplia gama de aplicaciones para las ISP en alimentos y no alimentos se han sugerido en el pasado, p.ej. ejemplificados en Griffith y Vanya Ewart (1995) *Biotechnology Advances* 13:375-402 y el documento EP2602263A2. Sin embargo, muchas aplicaciones no son actualmente factibles económicamente debido al alto coste en el uso de ISP.

El coste en el uso de dichas ISP debe ser tan bajo como sea posible para permitir el desarrollo de muchas aplicaciones diferentes. Aunque las AFP tipo III HPLC12 de zoarcas se usa actualmente para la producción de helados a escala industrial, las dificultades asociadas con la producción de ISP en grandes cantidades a un precio económico atractivo las descartan del uso en otras aplicaciones industriales. Una ISP ideal que puede usarse en diferentes aplicaciones sería altamente activa a baja concentración, baja en coste, fácilmente disponible y fácil de usar.

Un bajo coste en el uso de ISP puede obtenerse seleccionando una ISP que tenga alta actividad estructuradora del hielo por mol de proteína. La concentración mínima de la ISP mejor estudiada, y usada industrialmente (AFP tipo III procedente de zoarcas) para obtener la inhibición de la recristalización en una disolución de sacarosa al 30% a -6°C se ha presentado que es >700 nM (Smallwood *et al* (1999) *Biochem. J.* 340:385-391; Tomczak *et al* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 311: 1041-1046). En consecuencia, se necesita una concentración relativamente alta de ISP en la aplicación para obtener resultados satisfactorios. Unilever ha presentado que la concentración de ISP (AFP tipo III) en la aplicación de helados es ~50 mg/kg (p/p) (Lewis (2006) *Application for the Approval of Ice Structuring Protein Type III HPLC 12 Preparation for use in Edible Ices*, Regulación (EC) núm. 258/97 del parlamento europeo y del consejo del 27 de enero de 1997 relacionado con nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimenticios), que es equivalente a 7 µM para esta ISP. También se ha presentado que el crecimiento del cristal de hielo puede inhibirse mediante AFP tipo III 3-25 µM (Li y Hew (1991) *Protein engineering* 4:1003-1008). Una ISP que da un efecto similar con una menor dosis necesaria sería beneficiosa para disminuir el coste de uso de estas proteínas y abriría la posibilidad para desarrollar aplicaciones adicionales.

También la alta expresión de ISP por kg de caldo de fermentación llevará a un precio de coste reducido y un bajo coste de uso. La alta expresión llevará también a un producto más puro que solo necesita un mínimo de purificación, reduciendo así más el precio de coste.

La productividad de las ISP que se describen actualmente en la bibliografía es sin embargo baja. Se ha presentado que la expresión de AFP tipo III procedente de zoarcas en la levadura de panadero *Saccharomyces cerevisiae* es difícil (documento US 6914043 B1) y solo detectable cuando el sobrenadante del caldo de cultivo no estaba diluido, sugiriendo un bajo nivel de expresión.

Además la expresión de la ISP de *Leucosporidium* (LeIBP) en *Escherichia coli* o *Pichia pastoris* se describe que está entre 2,1 y 61,2 mg por litro de cultivo en matraz oscilante (Park *et al* (2012) *Cryobiology* 64:286-296), a pesar del historial de ambos microorganismos de expresar con éxito proteínas heterólogas a alto nivel.

Recientemente Lee *et al* han resumido toda la bibliografía en la expresión de ISP desconocidas y han concluido que los niveles de expresión no exceden los 175 mg/l (Lee *et al* (2013) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:3383-3393). Sugieren que la aplicación de ISP está obstaculizada en gran medida por la falta de unos sistemas de producción económicos.

Los mismos autores consiguieron aumentar la productividad de LeIBP a ~300 mg/l mediante un lote alimentado combinado y la inducción de la producción mediante la adición de metanol a temperatura reducida. Debido a la baja

productividad en la fermentación, la proteína tenía que concentrarse y purificarse antes de que pudiera usarse en más experimentos, llevando a un rendimiento muy pobre y consecuentemente un alto precio de coste. Dichas medidas pueden ser útiles para la fermentación a escala de laboratorio aunque no son económicas para la producción industrial. Debido a esto el coste en el uso de las ISP descritas actualmente es alto y por lo tanto el uso de ISP en la industria está limitado.

Además del coste en el uso también es importante que el producto final tenga estatus GRAS (considerado generalmente como seguro) para la aplicación de una ISP en un producto alimenticio. Muchas de las ISP descritas en la bibliografía se expresan en microorganismos o se producen con procesos que carecen de este estatus y no pueden por lo tanto usarse en aplicaciones alimenticias. Por ejemplo LeBP se expresa actualmente en *Pichia pastoris*, una levadura que necesita la adición de metanol tóxico para la inducción de la expresión de LeBP (Lee et al (2013)).

El documento KR 2012 0126794 describe la producción de la AFP en *Pichia*

El documento KR 2010 0137056 describe la secuencia de la AFP de *Leucosporidium* sp.

Lee et (2010, Cryobiology, vol. 60, núm. 2, páginas 222-228) describen la secuencia de la AFP de *Leucosporidium* sp.

Orquadea Ribeiro et al (2010, Applied microbiology and biotechnology, vol. 87, núm. 4, páginas 1437-1446) describen la expresión de endoglucanasa I y celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* en *Ashbya gossypii*.

Mackenzie et al (1993, Journal of general microbiology, páginas 2295-2307) describen la regulación de la producción de proteína secretada por hongos filamentosos.

Steiner et al (1994, Molecular and general genetics, páginas 263-271) describen la secuencia y análisis del promotor de un gen altamente expresado de *Ashbya gossypii*.

Por consiguiente, hay una necesidad de una ISP que sea altamente activa, baja en coste, fácilmente disponible en forma de grado alimentario, y sencilla de usar.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en la expresión exitosa de la proteína estructuradora del hielo procedente de *Leucosporidium* sp. (AFP19) en un hongo filamentosos. El nivel de expresión de AFP19 es, sorprendentemente, excepcionalmente alto en los hongos filamentosos, mucho mayor que el descrito en la bibliografía para la expresión en bacterias o levadura.

Además, la AFP19 como se expresa en los hongos filamentosos muestra muy buena actividad de inhibición de recristalización de hielo a concentraciones extremadamente bajas. Se muestra que esta ISP está activa en la recristalización de hielo a ~20 nM, una concentración 35 veces menor que la encontrada para la actual AFP tipo III estándar en la industria procedente de zoarcos.

Sorprendentemente, la productividad de AFP19 en un hongo filamentosos fue mayor que 1 g/l a escala de matraz oscilante. La productividad de la misma proteína a escala de matraz oscilante en levadura o bacterias se ha presentado en la bibliografía que es un factor 15-500 menor (denominado LeBP). Por lo tanto el coste en el uso de AFP19 expresado en hongos filamentosos será mucho menor que el de todas las ISP conocidas actualmente. Por consiguiente muchas más aplicaciones industriales pueden ser económicamente posibles usando AFP19 expresada en hongos filamentosos en comparación con las ISP conocidas actualmente.

Además, parece que la ISP como se produce en un hongo filamentosos es una proteína estable: propiedades de estabilización posibles son N- u O-glicosilación y/o un bloque mediante piroglutamato en el extremo N.

Según la invención, se proporciona por consiguiente una célula huésped fúngica filamentosos que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un constructo de ácido nucleico, en el que la célula huésped fúngica filamentosos es del género *Aspergillus*, y en la que dicho constructo de ácido nucleico comprende:

Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína estructuradora de hielo (ISP) que comprende la secuencia presentada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de al menos idéntica al 80% a ella; y, unida de forma operable a ella,

Secuencias de control que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped fúngica filamentosos del género *Aspergillus*.

La invención también proporciona:

- un método para la producción de una proteína estructuradora del hielo (ISP), cuyo método comprende:
- proporcionar una célula huésped fúngica filamentosa del género *Aspergillus* como se reivindica en la presente memoria;
- cultivar la célula huésped fúngica filamentosa bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína estructuradora del hielo; y, opcionalmente
- recuperar la proteína estructuradora del hielo;
- una proteína estructuradora del hielo que comprende la secuencia presentada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella, en la que:

- 10 Al menos un aminoácido es un aminoácido modificado y en la que el aminoácido modificado es un piroglutamato presente en el extremo amino;
- una composición alimenticia que comprende una proteína estructuradora del hielo de la invención;
 - un método para la preparación de una composición alimenticia, cuyo método comprende combinar una proteína estructuradora del hielo según la invención con uno o más ingredientes alimenticios;
- 15 - uso de una proteína estructuradora del hielo de la invención en una composición alimenticia; y
- una composición alimenticia o uso de la invención, en la que la composición alimenticia es un producto de confitería congelado, tal como un helado o un sorbete.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La Figura 1 muestra un mapa físico del vector pGBTOP-16 usado para la clonación del gen de AFP19. El vector pGBTOP-16 se deriva del vector pGBTOP-12 descrito en el documento WO 2011/009700. Además de pGBTOP-12, contiene el gen de *ccdB* de *E. coli* para la selección positiva para la presencia de un inserto entre los sitios de clonación *EcoRI* y *PacI*. El sitio de restricción *PacI* sustituye el sitio de restricción *SnaBI* presente en pGBTOP-12.
- La Figura 2 muestra la determinación de tamaño por LC MS/MS de AFP19 procedente de *Aspergillus niger*, antes y después del tratamiento con PNGasa F.
- 25 La Figura 3 muestra las masas detectadas de formas de AFP antes y después de la desglicosilación con PNGasa f. La forma truncada del extremo C de AFP con piroglutamato se indica en la Figura con rectángulos grises. 162 Da representa la masa de una hexosa.
- La Figura 4 muestra el comportamiento de fusión del hielo de sorbete producido con AFP19 procedente de *Aspergillus niger*.
- 30 La Figura 5 muestra el comportamiento de fusión del helado producido con AFP19 procedente de *Aspergillus niger*.

Descripción de la lista de secuencias

- 35 SEQ ID NO: 1 presenta la secuencia de proteína de la ISP de *Leucosporidium* (AFP19). Esta secuencia consiste en una secuencia señal de 20 aminoácidos para la eficiente secreción en *Leucosporidium* y una secuencia de proteína madura deducida de 241 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de AFP19 de *Leucosporidium* también se presenta en Swiss-Prot/TrEMBL (número de acceso: C7F6X3) y número de acceso Genbank ACU30807.1.
- SEQ ID NO: 2 presenta una secuencia de ADN adaptada al codón para la expresión de SEQ ID NO: 1 en *Aspergillus niger*.
- 40 SEQ ID NO: 3 presenta una secuencia de ADN adaptada al codón para la expresión de la SEQ ID NO: 1 en *Aspergillus niger* que contiene sitios de restricción adicionales para el subclonado en un vector de expresión de *Aspergillus*.

Descripción detallada de la invención

- 45 A lo largo de la presente memoria y las reivindicaciones de acompañamiento, las palabras “comprenden”, “incluyen” y “que tienen” y variaciones tales como “comprende”, “que comprende”, “incluye” y “que incluye” se van a interpretar de forma inclusiva. Es decir, se pretende que estas palabras expresen la posible inclusión de otros elementos o números enteros no enumerados específicamente, donde el contexto lo permita.

Los artículos “un” y “una” se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir a uno o al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. Por medio de ejemplo, “un elemento” puede indicar un elemento o más de un elemento.

La presente invención se refiere a la expresión de una proteína estructuradora del hielo (ISP), por ejemplo la procedente de una *Leucosporidium* sp., tal como AFP19, cuya longitud total de secuencia de aminoácidos se presenta en la SEQ ID NO: 1, en un hongo filamentoso. Se ha demostrado que el nivel de expresión de dichas proteínas es inesperadamente y excepcionalmente alto en los hongos filamentosos; mucho mayor que los niveles de expresión descritos en la bibliografía para bacterias o levadura.

Además, la ISP de la invención, como se expresa usando hongos filamentosos, puede distinguirse, al nivel químico, de la proteína equivalente aislada o bien de una fuente de tipo salvaje o de una proteína equivalente como se expresa en bacterias o levadura.

La ISP de la invención puede usarse en la preparación de una composición alimenticia, por ejemplo un helado o un sorbete.

El uso de la ISP de la invención da un número de ventajas o bien en la composición alimenticia final o en la preparación de dicha composición.

En relación a la preparación de una composición alimenticia, por ejemplo, el uso de una ISP de la invención permite el endurecimiento más lento en la preparación de una composición alimenticia congelada, por ejemplo en la preparación de un helado o sorbete. Esto puede permitir el uso de mayores tamaños de envase y/o el uso de menos entrada de energía en la congelación por chorro de aire durante el endurecimiento. Además, el uso de la ISP de la invención puede incluso llevar a la omisión de la etapa de endurecimiento durante la producción de helado y postres congelados, permitiendo un proceso de producción más rápido con menos costes energéticos. Además, el uso de una ISP de la invención puede posibilitar el uso reducido de estabilizantes durante la preparación de una composición alimenticia, tal como un helado o un sorbete.

En relación a una composición alimenticia propia como se prepara usando una ISP de la invención, dicha composición alimenticia puede tener una vida útil aumentada sin pérdida de calidad (en comparación con una composición alimenticia correspondiente preparada sin el uso de una ISP de la invención). En particular, una composición alimenticia preparada usando una ISP de la invención puede ser más resistente al choque térmico que una composición alimenticia no preparada con dicha ISP y puede ser posible almacenar dicha composición alimenticia a una mayor temperatura que una composición alimenticia no preparada con dicha ISP. La calidad de dicha composición alimenticia puede ser menos vulnerable a las fluctuaciones de temperatura que acompañan al transporte y tratamiento minorista de dicho producto alimenticio.

Además, la composición alimenticia resultante como se prepara usando una ISP de la invención puede tener propiedades de textura mejoradas, por ejemplo la composición alimenticia resultante puede ser más firme con mayor incorporación de aire de manera que pueden necesitarse menos ingredientes en la preparación de dicha composición alimenticia, y puede disminuirse la fusión de manera que hay menos goteo (de nuevo en comparación con una composición alimenticia equivalente no hecha con una ISP de la invención).

Por consiguiente, la invención se refiere a una célula huésped fúngica filamentosa que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un constructo de ácido nucleico, en la que la célula huésped fúngica filamentosa es del género *Aspergillus*, y en la que dicho constructo de ácido nucleico comprende:

Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína estructuradora de hielo (ISP) que comprende la secuencia presentada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella; y, unida de forma operable a ella,

Secuencias de control que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped fúngica filamentosa del género *Aspergillus*.

El término "constructo de ácido nucleico" hace referencia en la presente memoria a una molécula de ácido nucleico, o bien mono o bicatenaria, que se aísla de un gen que se da de forma natural o, más típicamente, que se ha modificado para contener segmentos de ácido nucleico que se combinan yuxtaponen de una manera que no existiría de otra forma en la naturaleza. Es decir, un constructo de ácido nucleico es un constructo recombinante, es decir, uno que no se da de forma natural. El término constructo de ácido nucleico es sinónimo con el término "casete de expresión" cuando el constructo de ácido nucleico contiene todas las secuencias de control necesarias para la expresión de una secuencia de codificación, en el que dichas secuencias de control se unen de forma operable a dicha secuencia de codificación.

Un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente memoria comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína estructuradora del hielo (ISP).

Para los propósitos de esta invención, "proteína estructuradora del hielo (ISP)" o, de forma alternativa, "proteína anticongelante (AFP)" o "proteína de unión al hielo" se refiere a un polipéptido capaz de unirse a pequeños cristales de hielo para inhibir el crecimiento y la recristalización de cristales de hielo. La inhibición de la recristalización (IR) puede medirse como se describe en el Ejemplo 4 (véase Tomczak et al (2003) Biochem. Biophys. Res. Comm. 311:

1041-1046).

Una ISP puede también, o de forma alternativa, ser un polipéptido que es capaz de crear o aumentar la diferencia entre el punto de fusión y el punto de congelación de una disolución, es decir, es uno que es capaz de aumentar la histéresis térmica de una disolución, en comparación con la misma disolución que no comprende una ISP. La histéresis térmica puede medirse con un osmómetro nanolitr Clifton.

La secuencia de ácido nucleico (comprendida en un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente memoria) codifica una ISP que comprende:

La secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella; o

La secuencia de aminoácidos presentada en los aminoácidos 21 a 261 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella.

La SEQ ID NO: 1 presenta la secuencia de proteína de la ISP de *Leucosporidium* (AFP19). Esta secuencia consiste en una secuencia señal de 20 aminoácidos para la secreción eficiente en *Leucosporidium* y una secuencia de proteína madura deducida de 241 aminoácidos.

En un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente memoria, la secuencia de ácido nucleico puede codificar una ISP que comprende la secuencia presentada en SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a ella.

Es decir, la secuencia de ácido nucleico usada en un constructo de ácido nucleico puede compartir al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de la identidad de la secuencia con o la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos presentada en los aminoácidos 21 a 261 de SEQ ID NO: 1.

En un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente memoria, el ácido nucleico codifica una ISP que comprende una secuencia de aminoácidos obtenible a partir de una levadura antártica del género *Leucosporidium*.

Para el propósito de esta invención, se define aquí que para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean por propósitos de comparación óptima. Para optimizar la alineación entre las dos secuencias pueden introducirse huecos en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Dicha alineación puede realizarse sobre la longitud total de las secuencias que se comparan. De forma alternativa, la alineación puede realizarse sobre una longitud más corta, por ejemplo sobre aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más en base a ácidos nucleicos o aminoácidos. La identidad de la secuencia es el porcentaje de emparejamientos idénticos entre las dos secuencias sobre la región alineada presentada.

La secuencia de aminoácidos de la ISP que se expresa realmente en unos hongos filamentosos puede no comprender todos los aminoácidos codificados teóricamente mediante la secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede ser más corta que la codificada teóricamente por la secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo en vista de aminoácidos perdidos de los extremos N y/o C terminales de la ISP (en comparación con la secuencia predicha). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más aminoácidos más corta que la secuencia madura predicha de aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1. En este caso, la identidad puede calcularse en base a una alineación que excluye esos aminoácidos teóricamente, pero realmente, presentes.

Por consiguiente, una secuencia de ácido nucleico (comprendida en un constructo de ácido nucleico) puede codificar una ISP que comprende:

La secuencia de aminoácidos presentada en los aminoácidos 21 a 260 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 259 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 258 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 257 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 256 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 255 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 254 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 253 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 252 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 251 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 250 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 249 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 248 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO: 1 o aminoácidos 21 a 246 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a cualquiera de ellas.

En otra opción preferida, la secuencia de aminoácidos de la ISP se ha modificado dando por resultado una expresión adicionalmente mejorada en unos hongos filamentosos según el método como se describe en el documento WO2010/102982.

Una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de la identidad de la secuencia entre dos

secuencias pueden conseguirse usando un algoritmo matemático. El experto será consciente del hecho de que están disponibles varios programas informáticos diferentes para alinear dos secuencias y determinar la identidad entre dos secuencias (Kruskal, J.B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff y J.B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, págs. 1-44 Addison Wesley). El porcentaje de identidad de la secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para la alineación de dos secuencias. (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Ambas secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos pueden alinearse mediante el algoritmo. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE. Para el propósito de esta invención se usó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) págs. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para las secuencias de proteína se usó EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. Para la secuencia de nucleótidos, se usó EDNAFULL. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de huecos de 10 y una penalización por extensión del hueco de 0,5. El experto apreciará que todos estos parámetros diferentes darán resultados ligeramente diferentes pero que el porcentaje total de identidad de dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan algoritmos diferentes.

Después de la alineación mediante el programa NEEDLE como se describe anteriormente el porcentaje de la identidad de la secuencia entre una secuencia de consulta y una secuencia de la invención se calcula como sigue: número de posiciones correspondientes en la alineación que muestran un aminoácido idéntico o nucleótido idéntico en ambas secuencias dividido por la longitud total de la alineación después de la resta del número total de huecos en la alineación. La identidad definida como en la presente memoria puede obtenerse de NEEDLE usando la opción NOBRIEF y se marca en el resultado del programa como "identidad más larga".

Las secuencias de ácido nucleico y proteína descritas en la presente memoria pueden usarse adicionalmente como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de la palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, 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 para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros de base de los respectivos programas (p.ej., XBLAST y NBLAST). Véase la página del Centro nacional para la información de biotecnología en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

La secuencia de ácido nucleico que codifica una ISP se une de forma operable para controlar las secuencias que permiten la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico en una célula huésped fúngica filamentosa.

El término "unido de forma operable" se define en la presente memoria como una configuración en que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición en relación a la secuencia que codifica la ISP de manera que la secuencia de control dirige la producción de un ARN o un ARNm y opcionalmente de un polipéptido traducido de dicho ARN(m).

El término "secuencias de control" se define en la presente memoria para incluir todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de ARNm y/o un polipéptido, o bien *in vitro* o en una célula huésped. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Dichas secuencias de control incluyen, aunque no están limitadas a, una secuencia Shine-Delgarno, líder, secuencias de iniciación de la traducción óptimas (como se describe en Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870), una secuencia de poliadenilación, una secuencia pro-péptido, una secuencia pre-pro-péptido, un promotor, una secuencia señal y un terminador de transcripción. Las secuencias señal usadas para optimizar la expresión se describen en el documento WO2010/121933. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden optimizarse para su propósito específico. Las secuencias de control optimizadas preferidas usadas en la presente invención son las descritas en el documento WO2006/077258.

Una o más secuencias de control pueden ser una secuencia de control que no se da de forma nativa en *Leucosporidium*, por ejemplo un *Leucosporidium* a partir del que se aisló originalmente la ISP.

Las secuencias de control pueden proporcionarse con conectores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido.

La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada (promotor). El término "promotor" se define en la presente memoria como una secuencia de ADN que se une a ARN polimerasa y dirige a la polimerasa al sitio de comienzo transcripcional correcto de la secuencia de ácido nucleico que codifica una ISP. La ARN

polimerasa cataliza de forma efectiva el ensamblaje del ARN mensajero complementario a la cadena de ADN apropiada de una región de codificación. El término "promotor" también se entenderá que incluye la región 5'-no codificante (entre el promotor y el comienzo de la traducción) para la traducción después de la transcripción en ARNm, los elementos de control de transcripción que actúan en cis tales como potenciadores, y otras secuencias de nucleótidos capaces de interaccionar con los factores de transcripción.

Un constructo de ácido nucleico puede ser uno en el que las secuencias de control comprenden un promotor no asociado de forma nativa con el ácido nucleico que codifica una ISP.

El promotor puede ser cualquier secuencia promotora apropiada adecuada para una célula huésped fúngica filamentosa, que muestra actividad transcripcional, que incluye promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de polinucleótidos que codifican polipéptidos extra-celulares o intracelulares o bien homólogos (nativos) o heterólogos (extraños) a la célula huésped fúngica filamentosa. El promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible.

El promotor puede ser un promotor inducible. El promotor puede ser un promotor inducible por carbohidrato. Los promotores inducibles por carbohidrato que pueden usarse son unos promotores de almidón, celulosa, hemicelulosa (tales como inducibles por xilano y/o xilosa). Otros promotores inducibles son promotores inducibles por cobre, ácido oleico. Los promotores adecuados en hongos filamentosos son promotores que pueden seleccionarse del grupo, que incluye aunque no está limitado a promotores obtenidos a partir de los polinucleótidos que codifican TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, alfa-amilasa estable con ácido de *A. niger*, glucoamilasa (glaA) de *A. niger* o *A. awamori*, endoxilanasas (*xlnA*) o beta-xilosidasa (*xlnD*) de *A. niger* o *A. awamori*, celobiohidrolasa I (CBHI) de *T. reesei*, lipasa de *R. miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae*, acetamidasa de *A. nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900) *Fusarium venenatum* Dania (documento WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (documento WO 00/56900), proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (documento WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasas I de *Trichoderma reesei*, xilanasas II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, además del promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores procedentes de polinucleótidos que codifican alfa-amilasa neutra de *A. niger* y triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae*), y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos. Otros ejemplos de promotores son los promotores descritos en los documentos WO2006/092396 y WO2005/100573. Incluso otro ejemplo del uso de promotores se describe en los documentos WO2008/098933 y PCT/EP2-13/062490. Los promotores pueden ser también promotores constitutivos.

La secuencia de control puede ser también una secuencia terminadora de la transcripción (terminador) adecuada, una secuencia reconocida por una célula fúngica filamentosa para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está unida de forma operable al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cualquier terminador, que es funcional en la célula, puede usarse en la presente invención. El experto en la técnica sabe que los tipos de terminadores pueden usarse en la célula huésped microbiana como se describe en la presente memoria.

Las secuencias terminadoras preferidas para células fúngicas filamentosas se obtienen de cualquier secuencia terminadora de un gen fúngico filamentoso, más preferiblemente de genes de *Aspergillus*, incluso más preferiblemente del gen de TAKA amilasa de *A. oryzae*, los genes que codifican glucoamilasa (glaA) de *A. niger*, antranilato sintasa de *A. nidulans*, alfa-glucosidasa de *A. niger*, trpC y/o proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

La secuencia de control puede ser también unas secuencias de iniciación de la traducción óptimas (como se describe en Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870), o una secuencia 5'-no traducida, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción mediante la célula huésped fúngica filamentosa. La secuencia de iniciación de la traducción o secuencia 5' no traducida está unida de forma operable al extremo 5' de la secuencia de codificación que codifica el polipéptido. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Las secuencias de control pueden optimizarse a su propósito específico.

Las secuencias 5' no traducidas adecuadas pueden ser esos polinucleótidos que preceden al gen de amiloglucosidasa (AG) fúngica, genes de TAKA amilasa de *A. oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus* y genes que codifican glucoamilasa glaA, alfa-amilasa, xilanasas y fitasa de *A. niger*.

La secuencia de control puede ser también una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción mediante la célula huésped fúngica filamentosa.

Una secuencia líder (o señal) puede estar unida de forma operable al extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cualquier líder, que sea funcional en la célula, puede usarse en la presente invención. Las secuencias líder pueden ser las que se originan a partir del gen de amiloglucosidasa (AG) fúngica (glaA-

versiones tanto de 18 como de 24 aminoácidos, p.ej. procedente de *Aspergillus*), el gen del factor α (levaduras, p.ej. *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la α -amilasa (amyE, amyQ y amyL) y los genes de proteasa alcalina aprE y proteasa neutra (Bacillus), o secuencias señal como se describen en el documento WO2010/121933.

5 Los líderes preferidos (o secuencias señal) para las células fúngicas filamentosas se obtienen de los polinucleótidos que preceden a TAKA amilasa de *A. oryzae* y glaA y fitasa de *A. niger*.

Otras secuencias de control pueden aislarse del gen de IPNS de *Penicillium*, o gen pcbC, el gen de beta tubulina.

10 La secuencia de control puede ser también una secuencia de poliadenilación, una secuencia que está unida de forma operable al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico y que, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped microbiana (mutada o parental) como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación, que sea funcional en la célula, puede usarse en la presente invención.

Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células fúngicas filamentosas se obtienen a partir de polinucleótidos que codifican TAKA amilasa de *A. oryzae*, glucoamilasa de *A. niger*, antranilato sintasa de *A. nidulans*, proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *A. niger*.

15 Para facilitar la expresión, la secuencia de ácido nucleico que codifica la ISP puede ser un polinucleótido sintético. Los polinucleótidos sintéticos pueden optimizarse en el uso del codón, preferiblemente según los métodos descritos en los documentos WO2006/077258 y/o PCT/EP2007/055943 (publicado como documento WO2008/000632). El documento PCT/EP2007/055943 aborda la optimización de pares de codones. La optimización de pares de codones es un método en el que las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido se han modificado con respecto a
20 su uso de codón, en particular los pares de codones que se usan, para obtener la expresión mejorada de la secuencia de nucleótidos que codifica la ISP y/o la producción mejorada de la ISP codificada. Los pares de codones se definen como un conjunto de dos tripletes (codones) posteriores en una secuencia de codificación.

25 Por consiguiente, un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente memoria puede ser uno en el que el ácido nucleico que codifica una ISP está optimizado en un par de codones para la expresión en una célula huésped fúngica filamentosa.

30 Para facilitar la expresión y/o traducción de la ISP, la secuencia de ácido nucleico que codifica la ISP puede estar comprendida en un vector de expresión de manera que el gen que codifica la ISP está unido de forma operable a las secuencias de control apropiadas para la expresión y/o traducción *in vitro*, o en la célula huésped fúngica filamentosa. Es decir, la invención describe un vector de expresión que comprende un constructo de ácido nucleico descrito en la presente memoria.

35 El vector de expresión puede ser cualquier vector (p.ej. un plásmido o virus), que puede someterse de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula en que el vector se va a introducir. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados. El vector puede ser un vector que se replica de forma autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extra-cromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p.ej., un plásmido, un elemento extra-cromosómico, un mini-cromosoma, o un cromosoma artificial. Un vector de clonación mantenido de forma autónoma puede comprender la secuencia AMA1 (véase p.ej. Aleksenko y Clutterbuck (1997), Fungal Genet. Biol. 21:373-397).

40 De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped fúngica filamentosa, se integra en el genoma y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en que se ha integrado. El vector de clonado integrante puede integrarse al azar o en una ubicación diana predeterminada en los cromosomas de la célula huésped. En una realización preferida de la invención, el vector de clonado integrante comprende un fragmento de ADN, que es homólogo a una secuencia de ADN en una ubicación diana predeterminada en el genoma de la célula huésped para dirigir la integración del vector de clonado a esta ubicación predeterminada. Para promover la
45 integración dirigida, el vector de clonado se linealiza preferiblemente antes de la transformación de la célula. La linealización se realiza preferiblemente de manera que al menos uno aunque preferiblemente cualquiera extremo del vector de clonado esté flanqueado por secuencias homólogas a la ubicación diana. La longitud de las secuencias homólogas que flanquean la ubicación diana es preferiblemente al menos de 30 pb, preferiblemente al menos de 50 pb, preferiblemente al menos 0,1 kb, incluso preferiblemente al menos 0,2 kb, más preferiblemente al menos 0,5 kb,
50 incluso más preferiblemente al menos 1 kb, lo más preferiblemente al menos 2 kb. Preferiblemente, la eficiencia de la integración dirigida en el genoma de la célula huésped fúngica filamentosa, es decir, la integración en una ubicación diana predeterminada, se aumenta mediante capacidades de recombinación homóloga aumentadas de la célula huésped.

55 Preferiblemente, las secuencias de ADN flanqueantes homólogas en el vector de clonado, que son homólogas a la ubicación diana, se derivan de una ubicación altamente expresada que significa que se derivan de un gen, que es capaz de alto nivel de expresión en la célula huésped. Un gen capaz de alto nivel de expresión, es decir, un gen altamente expresado, se define en la presente memoria como un gen cuyo ARNm puede preparar al menos 0,5% (p/p) del ARNm celular total, p.ej. bajo condiciones inducidas, o de forma alternativa, un gen cuyo producto génico

puede preparar al menos 1% (p/p) de la proteína celular total o, en caso de un producto génico secretado, puede secretarse a un nivel de al menos 0,1 g/l (como se describe en el documento EP 357 127 B1).

Un número de genes fúngicos altamente expresados preferidos se dan por medio del ejemplo: los genes de amilasa, glucoamilasa, alcohol deshidrogenasa, xilanas, gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa o celobiohidrolasa (cbh) de *Aspergilli*, *Chrysosporium* o *Trichoderma*. Los genes altamente expresados más preferidos para estos propósitos son un gen de glucoamilasa, preferiblemente un gen de glucoamilasa de *A. niger*, un gen de TAKA amilasa de *A. oryzae*, un gen de gpdA de *A. nidulans*, un gen de cbh de *Trichoderma reesei*, preferiblemente cbh1, un gen de cbh de *Chrysosporium lucknowense* o un gen de cbh de *P. chrysogenum*.

Más de una copia de un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente memoria puede insertarse en una célula huésped fúngica filamentosa para aumentar la producción de la ISP (sobre-expresión) codificada por la secuencia de ácido nucleico comprendida en el constructo de ácido nucleico. Esto puede hacerse, preferiblemente integrando en su genoma copias de la secuencia de ADN, más preferiblemente dirigiendo la integración de la secuencia de ADN a una de las ubicaciones altamente expresadas definidas en el párrafo anterior. De forma alternativa, esto puede hacerse incluyendo un gen marcador seleccionable aumentable con la secuencia de ácido nucleico donde las células que contienen copias aumentadas del gen marcador seleccionable, y por consiguiente las copias adicionales de la secuencia de ácido nucleico, pueden seleccionarse cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado. Para aumentar incluso más el número de copias de la secuencia de ADN a sobre-expresar puede usarse la técnica de conversión génica como se describe en el documento WO98/46772.

El sistema vector puede ser un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

Los vectores preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten la fácil selección de las células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. El marcador seleccionable puede introducirse en la célula en el vector de expresión como el casete de expresión o puede introducirse en un vector de expresión separado.

Un marcador seleccionable para usar en una célula fúngica filamentosa puede seleccionarse del grupo que incluye, aunque no está limitado a, amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfotricinacetiltransferasa), bleA (unión de fleomicina), hygB (higromicinfosfotransferasa), niaD (nitrato reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa), NAT o NTC (Nourseotricina) y trpC (antranilato sintasa), además de equivalentes de otras especies. Se prefieren para usar en una célula *Aspergillus* y *Penicillium* los genes de amdS (véase por ejemplo los documentos EP 635574 B1, EP0758020A2, EP1799821A2, WO 97/06261A2) y pyrG de *A. nidulans* o *A. oryzae* y el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*. Más preferiblemente se usa un gen de amdS, incluso más preferiblemente un gen de amdS de *A. nidulans* o *A. niger*. Un gen marcador seleccionable más preferido es la secuencia que codifica amdS de *A. nidulans* condensada al promotor de gpdA de *A. nidulans* (véase el documento EP 635574 B1). Otros marcadores de AmdS preferidos son los descritos en el documento WO2006/040358. También pueden usarse genes de amdS de otros hongos filamentosos (documento WO 97/06261).

Preferiblemente, cualquier marcador de selección se elimina de la célula huésped fúngica filamentosa después de la introducción del constructo de expresión para así obtener células huésped transformadas capaces de producir la ISP que están libres de los genes marcadores de selección.

Los procedimientos usados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión de la presente invención se conocen bien por un experto en la técnica (véase, p.ej. Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3ª Ed. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley InterScience, NY, 1995).

Además, técnicas de clonado molecular estándar tales como aislamiento de ADN, electroforesis en gel, modificaciones de restricción enzimática de ácidos nucleicos, análisis de Southern, transformación de células, etc., se conocen por el experto y se describen por ejemplo por Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York, e Innis et al. (1990) "PCR protocols, a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego.

Un ácido nucleico adecuado para usar en la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o de forma alternativa, ADN genómico, como una plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados según las técnicas de amplificación de PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN. Preferiblemente, la eficiencia de la integración dirigida en el genoma de la célula huésped, es decir, la integración en una ubicación diana predeterminada, se aumenta mediante capacidades de recombinación homóloga aumentadas de la célula huésped. Dicho fenotipo de la célula implica preferiblemente un *hdfA* o *hdfB* deficiente como se describe en el documento WO2005/095624. El documento WO2005/095624 describe un método preferido para obtener una célula fúngica filamentosa que comprende la eficiencia aumentada de la integración dirigida.

La invención proporciona por consiguiente una célula huésped fúngica filamentosa que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector de expresión como se describe en la presente memoria.

Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared de micelio compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante alargamiento de hifas y el catabolismo del carbono es obligadamente aeróbico.

Las células huésped fúngicas filamentosas adecuadas pueden ser aquellas en el Clado 2: *Aspergillus* como se describen en la Figura 1 de Houbraeken y Samson, 2011 (*supra*).

Las células huésped fúngicas filamentosas adecuadas, adecuadas para usar en la invención son células de *Aspergillus*.

Las células fúngicas filamentosas preferidas pertenecen a unas especies de un *Aspergillus*, y lo más preferiblemente unas especies de *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus fumigatus* o *Aspergillus oryzae*. Una célula huésped más preferida pertenece al género *Aspergillus*, más preferiblemente la célula huésped pertenece a la especie *Aspergillus niger*. Cuando la célula huésped según la invención es una célula huésped *Aspergillus niger*, la célula huésped es preferiblemente CBS 513.88, CBS 124.903 o un derivado de los mismos.

Varias cepas de hongos filamentosos son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivo, tales como Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Colección de cultivo de patentes del servicio de investigación agrícola, Centro de investigación regional del norte (NRRL), y Colección de toda Rusia de microorganismos de la academia rusa de ciencias (abreviatura en ruso –VKM, abreviatura en inglés – RCM), Moscú, Rusia. Las cepas útiles en el contexto de la presente invención pueden ser *Aspergillus niger* CBS 513.88, CBS 124.903, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, CBS205.89, ATCC 9576, ATCC 14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *Aspergillus sojae* ATCC11906 y derivados de los mismos.

Las células huésped fúngicas filamentosas preferidas tales como células huésped *A. niger*, por ejemplo contienen posiblemente una, más o todas las siguientes modificaciones: deficiente en una péptido sintasa no ribosómica preferiblemente deficiente en una péptido sintasa no ribosómica npsE (véase el documento WO2012/001169), deficiente en pepA, deficiente en glucoamilasa (glaA), deficiente en alfa-amilasa estable en ácido (amyA), deficiente en alfa-amilasa neutra (amyBI y amyBII), deficiente en ácido oxálico hidrolasa (oahA), deficiente en una o más toxinas, preferiblemente ocratoxina y/o fumonisina, deficiente en prtT, deficiente en hdfA, comprende una modificación SEC 61 que es una mutación S376W en que la Serina 376 se sustituye por triptófano y/o comprende un amplicón adaptado como se define en los documentos WO2005/123763 y/o WO2011/009700. Estas y otras posibles modificaciones del huésped se describen también en los documentos WO2012/001169, WO2011/009700, WO2007/062936, WO2006/040312 o WO2004/070022, WO2013/135729, WO2014/013074, WO2014/013073.

Los expertos en la técnica saben cómo transformar células con el uno o más constructos o vectores de expresión de ácido nucleico como se describe en la presente memoria.

La transformación de la célula huésped fúngica filamentosa puede realizarse por cualquier método conocido adecuado, incluyendo p.ej. métodos de electroporación, bombardeo de partículas o bombardeo de microproyectiles, métodos de protoplastos y transformación mediada por *Agrobacterium* (AMT). Los procedimientos para la transformación se describen mediante J.R.S. Fincham, Transformation in fungi. 1989, Microbiological reviews. 53, 148-170.

La transformación puede implicar un proceso que consiste en la formación de protoplastos, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células de *Aspergillus* se describen en el documento EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474. Los procedimientos adecuados para la transformación de *Aspergillus* y otras células huésped fúngicas filamentosas que usan *Agrobacterium tumefaciens* se describen en p.ej. De Groot *et al.*, *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi*. Nat Biotechnol. 1998, 16:839-842. Errata en: Nat Biotechnol 1998 16:1074. Otros métodos pueden aplicarse tal como un método que usa la transformación biolística como se describe en: Christiansen *et al.*, *Biolistic transformation of the obligate plant pathogenic fungus, Erysiphe graminis f.sp. hordei*. 1995, Curr Genet. 29:100-102.

La invención proporciona además un método para la producción de una proteína estructuradora del hielo (ISP), cuyo método comprende:

a. proporcionar una célula huésped fúngica filamentosa del género *Aspergillus* como se reivindica en la presente memoria:

b. cultivar la célula huésped fúngica filamentosa bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína estructuradora del hielo; y, opcionalmente

c. recuperar la proteína estructuradora del hielo.

Típicamente, la ISP se secreta a partir de la célula huésped, por ejemplo durante la etapa de cultivo.

En la etapa a. una célula huésped microbiana mutante puede ser una célula huésped del hongo filamentoso de la invención como se describe en la presente memoria.

- 5 En la etapa b. la célula huésped del hongo filamentoso de la etapa a. se cultiva en condiciones favorables a la expresión de la ISP. Las células microbianas mutantes se cultivan en un medio nutriente adecuado para la producción de la ISP que usa métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse mediante cultivo en matraz oscilante, fermentación a pequeña escala o gran escala (que incluyen fermentaciones continuas, en lotes, en lotes de alimentación, o estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizado en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que la ISP se produzca y/o aisle. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, p.ej., *Bennett, J.W. y LaSure, L., eds., More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, CA, 1991*). Los medios adecuados están disponibles de distribuidores comerciales o pueden prepararse usando composiciones publicadas (p.ej., en catálogos de la Colección americana de cultivos tipo).
- 10
- 15 Si la ISP se secreta en el medio nutriente, la ISP puede aislarse directamente del medio. Si la ISP no se secreta, puede aislarse de los lisatos celulares.

- En la etapa c., la ISP puede aislarse opcionalmente. La ISP puede aislarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la ISP puede aislarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, aunque no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverizado, evaporación o precipitación. La ISP aislada puede entonces purificarse adicionalmente mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, aunque no están limitados a, cromatografía (p.ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoco y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (p.ej. enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (p.ej., precipitado con sulfato de amonio) o extracción (véase, p.ej., *Protein Purification, J.C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989*). En algunas aplicaciones la ISP pueden usarse sin aislamiento sustancial del caldo de cultivo; la separación del medio de cultivo de la biomasa puede ser adecuada.
- 20
- 25

En un método de la invención, la productividad de la ISP puede ser al menos 1 g/L, al menos 2 g/L, al menos 5 g/L, tal como 10 g/L o superior.

- La invención también proporciona una proteína estructuradora del hielo que comprende la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella, en la que:
- 30

Al menos un aminoácido es un aminoácido modificado y en la que el aminoácido modificado es un piroglutamato presente en el extremo amino.

- Se describe además en la presente memoria una proteína estructuradora del hielo que comprende la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% de ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella, en la que:
- 35

Al menos un aminoácido es un aminoácido modificado, por ejemplo que comprende una modificación de piroglutamato en su extremo N;

- Al menos un aminoácido está O-manosilado, por ejemplo que comprende una, dos, tres, cuatro o más O-manosilaciones;
- 40

La proteína tiene un patrón de glicosilación distinto de 2 unidades GlcNac y 2 hexosas, por ejemplo 2GlcNac y tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más unidades hexosa; o

La proteína carece de VVQKRSNARQWL, VQKRSNARQWL y KRSNARQWL en el extremo C.

- Es decir, la proteína puede tener un truncamiento C-terminal de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más aminoácidos con referencia a la proteína presentada en la SEQ ID NO: 1.
- 45

En dicha proteína estructuradora del hielo, el aminoácido modificado es un piroglutamato, presente en el extremo N de la proteína (es decir, en un aminoácido correspondiente al aminoácido 21 en la SEQ ID NO: 1).

- Una proteína estructuradora del hielo de la invención puede comprender 2 unidades de N-acetilglucosamina (GlcNac) y 10 de hexosa (Hex). Una proteína estructuradora del hielo de la invención puede estar O-manosilada en una posición correspondiente a S80 y/o T84 con referencia a la SEQ ID NO: 1. La forma más abundante de AFP19 contiene un grupo O-manosilo.
- 50

Una ISP de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 1 o una

secuencia al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idénticas a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a ella.

- 5 La ISP de la invención, por ejemplo como se obtiene por un método de la invención, puede usarse en la preparación de una composición alimenticia. Por consiguiente, la invención proporciona una composición alimenticia que comprende una ISP de la invención, por ejemplo como se obtiene mediante un método de la invención.

- 10 Las composiciones alimenticias preferidas son productos de confitería congelados, tales como helados, yogur helado, postres helados, sorbete, sorbete sin grasa, helado de leche, natillas heladas, sorbetes, helados granizados y purés de fruta helados, helado de crema, frappé, granizado, batidos de frutas, raspado helado, copos, semifreddo, batidos de leche o helado italiano.

El nivel de ISP puede ser de 0,00001 a 0,5% en peso en base a la composición final.

Una composición alimenticia de la invención, tal como un producto de confitería helado, el nivel de sólidos en el confite helado (p.ej. azúcares, grasas, sabores, etc.) pueden ser más del 4% en peso, por ejemplo más del 20% en peso, tal como de 20% a 60%, por ejemplo 30% a 45% en peso en base a la composición final.

- 15 En el caso de una composición de helado, por ejemplo, los ingredientes ilustrativos y cantidades de los mismos son como sigue:

El agua puede ser de 40 a 80% en peso de la composición.

- 20 El agente edulcorante puede ser de 5-30%, de 10-25% o de 15-20% en peso de la composición. Los agentes edulcorantes bajos en calorías tal como sucralosa, sacarina o aspartama pueden usarse como agentes edulcorantes como pueden ser uno o más azúcares. El término azúcar incluye un monosacárido, un disacárido, un polisacárido, un alcohol de azúcar, o una mezcla de los mismos, el monosacárido es un compuesto químico de fórmula general $C_nH_{2n}O_n$ donde $n = 3-7$, y el disacárido es un producto de condensación de cualquiera de dos monosacáridos idénticos o diferentes. Los monosacáridos adecuados incluyen glucosa y fructosa. Un disacárido adecuado es sacarosa. Los agentes edulcorantes también incluyen jarabes de maíz (también llamados jarabes de glucosa), que son mezclas de mono-, di- y sacáridos superiores y alcoholes de azúcar.

- 25 Los sólidos de leche pueden ser de 5 a 40% en peso de la composición. Los sólidos de leche incluyen sólidos de leche que no son grasa (lactosa, proteína de leche y minerales) y grasa de leche (también denominada grasa butírica). Los sólidos de leche pueden estar presentes en una cantidad de al menos 10%, tal como al menos 15%, por ejemplo 20% en peso de la composición. La composición puede comprender hasta 35%, hasta 30% o hasta 25% de sólidos de leche. Los sólidos de leche pueden añadirse a la composición en forma de polvo de leche. De forma alternativa, puede añadirse leche fresca o leche pasteurizada a la composición para proporcionar la cantidad necesaria de sólidos de leche.

Una composición de helado puede comprender grasa. En este caso, la grasa puede ser de 2-20%, de 4-18% o de 6-16% en peso de la composición. La grasa puede ser de una grasa vegetal y/o grasa de leche.

- 35 Una composición de helado puede comprender 1-10%, tal como 2-9%, por ejemplo 3-8% de proteína. La proteína puede ser una proteína de trigo, proteína de soja o proteína de leche.

Una composición de helado puede comprender otros ingredientes opcionales que incluyen aromas, fruta/vegetales y chocolate.

- 40 Una ISP de la invención puede combinarse con uno o más ingredientes alimenticios para preparar una composición alimenticia de la invención. Es decir, la invención proporciona un método para la preparación de una composición alimenticia, cuyo método comprende combinar una proteína estructuradora del hielo de la invención con uno o más ingredientes alimenticios, para preparar así una composición alimenticia.

- 45 Los productos de confitería congelados según la invención pueden producirse por cualquier método adecuado para la producción de confitería congelada. Típicamente, todos los ingredientes de la composición se mezclan completamente antes de que empiece el proceso de congelación. El proceso de congelación puede implicar de forma ventajosa una etapa de endurecimiento, por ejemplo a una temperatura de -30°C o menor.

La invención también proporciona el uso de una proteína estructuradora del hielo de la invención en una composición alimenticia.

- 50 Una referencia en la presente memoria a un documento de patente u otro material que se da como la técnica anterior no se va a tomar como una admisión de que ese documento o material se conociera o que la información que contiene era parte del conocimiento general normal al mismo tiempo que la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos:

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación y expresión del gen de AFP19

La secuencia de proteína de la ISP de *Leucosporidium* (AFP19) se dedujo de la secuencia génica publicada y se muestra en la SEQ ID NO: 1. Esta secuencia consiste en una secuencia señal de 20 aminoácidos para la secreción eficiente en *Leucosporidium*, y una secuencia de proteína madura deducida de 241 aminoácidos.

Se diseñó una secuencia de ADN adaptada al codón para la expresión de esta proteína en *Aspergillus niger* que contenía sitios de restricción adicionales para el subclonado en un vector de expresión de *Aspergillus*. La adaptación al codón se realizó como se describe en el documento WO2008/000632. La secuencia de ADN del gen que codifica la proteína ISP de la SEQ ID NO: 1 se muestra en la SEQ ID NO: 2.

La secuencia de inicio traduccional del promotor de glucoamilasa *glaA* se ha modificado en 5'-CACCGTCAAA ATG-3' y se usó una secuencia de terminación traduccional óptima 5'-TAAA-3' en la generación del constructo de expresión (como también se detalla en el documento WO2006/077258). Un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 3), que contenía entre otros parte del promotor de glucoamilasa y el gen que codifica la ISP, se sintetizó completamente, se purificó y se digirió con *EcoRI* y *PacI*. El vector pGBTOP-16 (Figura 1) se linealizó mediante digestión con *EcoRI*/*PacI* y el fragmento de vector linealizado se purificó posteriormente por extracción en gel. El fragmento de ADN se clonó en el vector pGBTOP-16 y el vector resultante se llamó pGBTOPAFP-19. Posteriormente, se transformó GBA 306 de *A. niger* con este vector pGBTOPAFP-19, en un protocolo de co-transformación con pGBAAS-4, con la cepa y los métodos como se describe en el documento WO 2011/009700 y las referencias en él, y se seleccionó en medio que contenía acetamida y la colonia se purificó según los procedimientos estándar. GBA306 de *A. niger* se deriva en última instancia de CBS124.903 (depositado en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Países Bajos). La transformación y selección se realizó como se describe en los documentos WO 98/46772 y WO 99/32617. Las cepas que contienen el gen de AFP19 se seleccionaron por medio de PCR con cebadores específicos para el gen de AFP19 para verificar la presencia del casete de expresión pGBTOPAFP-19. Se seleccionó un único transformado, llamado AFP19-3, y se replicó adicionalmente para obtener un inóculo de cepa única.

Ejemplo 2: Fermentación y purificación de AFP19 en *Aspergillus niger*

Se prepararon esporas frescas de AFP19-3 de *A. niger*. 4 matraces oscilantes con 100 ml de medio de fermentación 1 (10% en p/v de sólidos de maíz fermentado, 1% en p/v de glucosa.H₂O, 0,1% en p/v de NaH₂PO₄.H₂O, 0,05% en p/v de MgSO₄.7H₂O, 0,025% en p/v de Basildon, pH 5,8) en matraces oscilantes de 500 ml con deflector se inocularon con 10⁷ esporas. Estos pre-cultivos se incubaron a 34°C y 170 rpm durante 16-24 horas. De los pre-cultivos, se usaron 50 ml para la inoculación de 4 matraces oscilantes con 1 litro de medio de fermentación 2 (15% en p/v de maltosa, 6% en p/v de bacto-soytone, 1,5% en p/v de (NH₄)₂SO₄, 0,1% en p/v de NaH₂PO₄.H₂O, 0,1% en p/v de MgSO₄.7H₂O, 0,1% en p/v de L-arginina, 8‰ en p/v de Tween-80, 2‰ en p/v de Basildon, 2% en p/v de MES pH 5,1) en un tamaño de matraz oscilante de 5 litros y se agitó a 34°C y 170 rpm. Después de cuatro días de cultivo, se acabó con las células añadiendo 3,5 g/l de benzoato sódico y manteniéndolas a 30°C durante seis horas. Posteriormente, se añadieron 10 g/l de CaCl₂ y 45 g/l de Perlite C25 al caldo de cultivo. La filtración se llevó a cabo en una etapa usando tela filtrante y filtros DE60/EKS P y K250 (Pall). La torta de filtrado que quedó en el filtro se lavó con 1,1 l de agua milliQ estéril. Se realizó una filtración estéril posterior usando Membrana GP Express PLUS 0,22 m (Millipore). Se realizó una ultrafiltración en el sistema de ultrafiltración Pellicon 2 "mini" con el casete Biomax5k (Millipore) y se lavó con Na-acetato 50 mM, pH 5,6. La composición de proteína de las muestras purificadas en todas las etapas se controló mediante SDS-PAGE al 4-12% y se encontró que era AFP19 pura en >90%. La concentración de proteína se controló en todas las etapas midiendo a A260/A280. La concentración se determinó según la fórmula $c(\text{mg/ml}) = (1,55 \cdot A_{280}) - (0,76 \cdot A_{260})$. Finalmente se obtuvo una muestra de 150 ml con una concentración de proteína de 30,8 mg/ml, que indicó que la productividad de AFP19 era >1 g/kg de caldo de fermentación. El preparado final se secó por congelación y se almacenó a -20°C hasta el uso.

Ejemplo 3: Expresión y fermentación del gen de AFP19 en *Aspergillus oryzae*

Se usó la cepa CBS205.89 de *Aspergillus oryzae* (depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Países Bajos y disponible públicamente) como vectores huésped y circular vector pGBTOPAFP-19 y pGBAAS-4, descritos en el Ejemplo 1, se usaron en un protocolo de co-transformación. La transformación se realizó como se describe en los documentos WO 98/46772 y WO 99/32617, y la selección fue en medio que contenía acetamida con cloruro de cesio 20 mM añadido. Las colonias se purificaron según procedimientos estándar. Las cepas que contenían el gen de AFP19 se seleccionaron por medio de PCR con cebadores específicos para el gen de AFP19 para verificar la presencia del casete de expresión pGBTOPAFP-19. Se seleccionó un único transformado, llamado AFPao-7, y se replicó en placa adicionalmente para obtener un inóculo de cepa única. Como control se transformó una cepa de *Aspergillus oryzae* con plásmido pGBTOP-16 en vez de pGBTOAFP-19, y se obtuvo un inóculo de cepa única por replicación en placa. Se prepararon esporas frescas de AFPao-7 de *A. oryzae* y se cultivaron como se describe en el ejemplo 2. El cultivo se realizó durante 72 horas a 30°C y 170 rpm en matraz oscilante. El sobrenadante se cosechó por centrifugado y se almacenó a -20°C hasta el análisis adicional.

La concentración de proteína AFP19 producida por AFPao-7 de *Aspergillus oryzae* se determinó usando análisis SDS-PAGE del sobrenadante y comparación con una dilución en serie de la AFP19 relativamente pura del *Aspergillus niger* del Ejemplo 2. El sobrenadante del cultivo de la cepa de control que carece del gen de AFP19 se analizó en paralelo en el mismo gel. Después de teñir el gel con azul brillante de Coomassie, la tinción se cuantificó y se comparó con la dilución en serie de AFP19 de *A. niger*. La cantidad de AFP19 producida por *Aspergillus oryzae* se estimó que era 0,4 g/l, claramente más que los 61,2 mg/l de LeBP producido en el matraz oscilante en *Pichia pastoris* (Park *et al.* 2012, *supra*). Esta cantidad se confirmó midiendo la concentración de proteína total en el sobrenadante usando tinte de proteína Bradford después de deducir la intensidad de tinción del sobrenadante de la cepa de control.

Ejemplo 4: Análisis de AFP19 de *Aspergillus niger*

La AFP19 como se aisló en el Ejemplo 2 a partir de *Aspergillus niger* se caracterizó adicionalmente usando LC-MS/MS. Para esto 1 mg de proteína AFP19 como se aisló en el Ejemplo 2 se diluyó hasta 100 µg/ml en NH₄HCO₃ 100 mM. Para la desglicosilación, 100 µl de esta disolución se calentó durante 10 min a 90°C. Se añadieron 15 µl de PNGasa F (Sigma, 1 U/µl) y después se incubó durante 4 horas en un termomezclador a 1000 rpm y 37°C. Se añadió ácido fórmico al 1% a las muestras antes de medir. Como un control se analizó proteína AFP19 no tratada.

Para el análisis LC-MS/MS las muestras se analizaron en el Acquity I-class-Synapt G2-S (Waters), con los siguientes parámetros: columna: columna Waters Acquity UPLC BEH300 C4 1,7 µm 300 Å de tamaño de poro de 2,1x50 mm. Temperatura de la columna: 75°C. Volumen de inyección: 5 µl. Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1% en agua. Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. Se aplicó un gradiente a la columna variando la fase A y B para separar las diferentes formas de la proteína AFP19.

Los ajustes del detector de MS fueron: el intervalo de adquisición de masas fue 500-3500 m/z, tiempo de barrido de 1 segundo, modo de resolución ESI, TOF MS positivo, con corrección de datos con Leu-Enk aplicado al vuelo durante la ejecución. La deconvolución espectral de datos, extracción del estado de carga, se realizó con una herramienta de software Waters MassLynx MaxEnt1: masa de salida – resolución = 1 Da /canal. Modelo de daño: Gaussiano (FWHH = 0,750 Da; relaciones de intensidad mínima = 33% izquierda y derecha). Iterar para converger.

La masa de AFP19 se determinó antes y después de la desglicosilación enzimática usando esta técnica y los resultados se representan en la Figura 2.

Se pueden sacar varias conclusiones a partir de estos resultados

- El tamaño de la forma más pequeña de AFP19 después del tratamiento de PNGasa F es 23446 Da. Este tamaño es menor que el peso molecular calculado en base a la secuencia de proteína representada en la SEQ ID NO: 1 asumiendo la eliminación de la pre-secuencia después del residuo 20. Esto indica que la AFP19 producida en *A. niger* está perdiendo parte de la secuencia de proteína. Como el tamaño no se ajusta exactamente al tamaño de ninguna supresión de aminoácidos no podemos excluir que otras modificaciones puedan haber ocurrido durante la producción de AFP19 en *A. niger*. P.ej. es posible que la AFP19 contenga una modificación piroglutamato en su extremo N.

- AFP19 es heterogénea en tamaño, incluso después del tratamiento de PNGasa F. Se encuentran cuatro picos con un aumento de 162 Da (el tamaño de una unidad de hexosa) después del tratamiento de PNGasa F y la forma más abundante es 23770 Da. Esto indica que la AFP19 producida en *A. niger* contiene una glicosilación adicional, que no se elimina por PNGasa F. La AFP19 puede O-manosilarse con hasta 4 residuos de manosilo por molécula de AFP19, teniendo la forma más abundante 2 grupos manosilo. No se ha detectado O-manosilación con las diferentes formas de LeBP estudiadas en la técnica anterior (Lee *et al.*, 2012, *Journal of Biological Chemistry* 287, 11460-11468; Lee *et al.*, 2013 *supra*)

- La diferencia de tamaño entre la forma N-glicosilada más abundante y la forma desglicosilada más abundante es 2026 Da, que indica que la forma N-glicosilada principal contiene 2 unidades de N-acetilglucosamina (GlcNac) y 10 de hexosa (Hex), además de 2 O-manosas. La diferencia de tamaño mínimo entre AFP19 N-glicosilada y AFP19 tratada con PNGasa F es 892 Da, representativo para 2 unidades de GlcNac y 3 Hex. Este resultado indica que todas las formas de AFP19 producidas en *A. niger* están N-glicosiladas (y O-manosiladas) de forma diferente que la LeBP producida en *P. pastoris* que se mostró que contenía solo 2 unidades de GlcNac y 2 Hex (Bma y Man) (Lee *et al.*, 2012).

- Usando este método se volvió evidente que el peso molecular de la forma más abundante de AFP19 producida en *Aspergillus niger* es 25796 Da. Este tamaño es diferente del tamaño medido por MALDI-TOF tanto para la LeBP nativa como para las formas no glicosilada y N-glicosilada producidas en *E. coli* o *P. pastoris* (Lee *et al.*, 2013).

Estos resultados indican que la AFP19 es claramente diferente de las diferentes formas de LeBP estudiadas en la técnica anterior.

Ejemplo 5: Análisis de la AFP19 de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*

La AFP19 como se aisló en el Ejemplo 2 (*Aspergillus niger*) y el Ejemplo 3 (*Aspergillus oryzae*) se caracterizaron adicionalmente usando LC-MS/MS. Para esto se diluyó 1 mg de proteína AFP19 hasta 100 µg/ml en NH₄HCO₃ 100 mM. Se calentaron 100 µl de esta disolución durante 10 min a 90°C. Se analizó la AFP19 como tal, después de la desglicosilación con PNGasa F, después de la digestión con LysC y después de la digestión con AspN. Para la desglicosilación, se añadieron 15 µl de PNGasa F (Sigma, 1 U/µl) y después se incubó durante 16 horas en un termomezclador a 1000 rpm y 37°C. Se añadió ácido fórmico al 1% a las muestras antes de medir. Como control se analizó proteína AFP19 no tratada.

Para el análisis LC-MS/MS las muestras se analizaron en el Acquity I-class – Synapt G2-S (Waters), con los siguientes parámetros: Columna: columna Acquity UPLC BEH300 C4 1,7 µm 300 Å de tamaño de poro de 2,1x50 mm (Waters). Temperatura de la columna: 75°C. Volumen de inyección: 1 µl. Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1% en agua. Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. Se aplicó un gradiente a la columna variando la fase A y B para separar formas diferentes de la proteína AFP19.

Los ajustes del detector de MS fueron: intervalo de adquisición de masas fue 500-3500 m/z, tiempo de barrido 1 segundo, modo de resolución ESI, TOF MS positivo, con corrección de datos con Leu-Enk aplicado al vuelo durante la ejecución. La deconvolución espectral de datos, extracción del estado de carga, se realizó con una herramienta de software Waters MassLynx MaxEnt1: masa de salida – resolución = 1 Da/canal. Modelo de daño: Gaussiano (FWHH = 0,750 Da; relaciones de intensidad mínima = 33% izquierda y derecha). Iterar para converger. La deconvolución espectral de datos para ETD, se realizó con la herramienta de software MassLynx MaxEnt3 para máximo de 7 cargas: núm. de miembros de ensamblaje: 2 e iteración por miembro de ensamblaje: 50.

Para la digestión de AFP19, se usaron Lys C y Asp N en paralelo. Se añadieron 20 µl (2 µg) de Lys C o Asp N a 100 µl (100 µg) y 400 µl (100 µg) de AFP19, respectivamente. La digestión se realizó por incubación a 37°C toda la noche. Las muestras se diluyeron dos veces en agua MilliQ y las muestras se acidularon con ácido fórmico al 1% antes del análisis de LC-MS/MS. Los análisis de LC-MS/MS de las muestras de AFP19 digeridas se realizaron en el Ultimate RS 3000 Orbitrap Fusion (Thermo Fisher) con los parámetros siguientes: Columna: Zorbax XDB-C18 1,8 µm de 2,1x50 mm; precolumna de diámetro estrecho de 2,1x12,5 mm 5-micras, Phoroshell 300SB-C3 (Agilent). Temperatura de columna: 50°C. Volumen de inyección: 25 µl. Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1% en agua. Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. Se aplicó un gradiente a la columna variando la fase A y B.

Los datos se buscaron frente a la secuencia de AFP19 (FDR 0,1%). La búsqueda en la base de datos se realizó en el Proteome Discoverer 1.4.1.14.

Los espectros de masas deconvolucionados de la AFP19 intacta antes y después de la desglicosilación con PNGasa F se muestran en la Figura 3.

Estos datos mostraron que la AFP19 expresada en *A. niger* tiene un piroglutamato en el extremo amino. Esta observación se confirmó por Disociación por transferencia electrónica (ETD) en la enzima intacta además de por identificación del péptido N-terminal después de la digestión con LysC de la AFP19. El piroglutamato puede jugar un papel importante en la estabilidad enzimática y no se ha descrito en la bibliografía interior en LeBP (Lee et al, 2012 *supra*; Lee et al, 2013 *supra*).

La comparación de los datos de LC-MS en la AFP19 intacta antes y después de la desglicosilación mostró que la forma N-glicosilada principal contiene 2 unidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y 10 de Hexosa (Hex) como se indica en la Figura 3. La AFP19 desglicosilada mostró incrementos de masa de 162 Da, indicando que la enzima está también O-manosilada, después de la N-glicosilación. Estos descubrimientos se confirmaron en la digestión con AspN de AFP19, donde la O-manosilación se identificó en la posición S80 y T84 en la SEQ ID NO: 1. La forma más abundante de AFP19 contiene un grupo O-manosilo. Además del piroglutamato amino-terminal, también la O-manosilación puede tener un efecto positivo en la estabilidad de la enzima. De nuevo, estos descubrimientos no se han descrito en la bibliografía previa en la AFP (Lee et al, 2012 *supra*; Lee et al, 2013 *supra*). Las observaciones tanto en la N-glicosilación como la O-manosilación mostraron que el patrón de glicosilación de la AFP19 descrito aquí es claramente diferente del LeBP nativo o LeBP producido en *Pichia pastoris* (Lee et al, 2012 *supra*).

El análisis de LC-MS en la AFP19 intacta antes y después de la desglicosilación mostró además que la enzima expresada en *A. niger* tiene un truncamiento en el extremo C. Las masas observadas 23444 Da, 23543 Da y 23770 Da, respectivamente corresponden a AFP19 con piroglutamato en el extremo N y la carencia de VVQKRSNARQWL, VQKRSNARQWL y KRSNARQWL en el extremo C.

Los experimentos mencionados anteriormente se realizaron también en la AFP19 expresada en *Aspergillus oryzae* (muestra cómo se produjo en el Ejemplo 3). Estos datos confirmaron que la expresión en *A. oryzae* también da por resultado AFP con piroglutamato en el extremo N y los patrones de N-glicosilación y O-manosilación fueron altamente similares a los de la AFP19 expresada en *A. niger*. Además ni la masa del LeBP nativa (25565 Da), de *E. coli*, ni la masa de LeBP glicosilada (26198 Da) y LeBP no glicosilada (25150 Da) de *P. pastoris* presentados anteriormente (Lee et al., 2013) se detectaron en nuestras muestras.

Ejemplo 6: Inhibición de la re-cristalización de hielo con AFP de *Aspergillus niger*

El punto final de IR para la AFP tipo III de zoarcas en sacarosa al 30% se presentó que era >700 nM por dos autores diferentes (Smallwood et al., 1999, *supra*; Tomczak et al., 2003, *supra*). El punto final de IR es la concentración por debajo de la cual la actividad de IR no se detectó más. Como el punto final de IR es un parámetro importante para la determinación de la efectividad de una ISP en la inhibición de la recrystalización del hielo, se decidió determinar el punto final de IR en sacarosa al 30% para AFP19 usando el ensayo de aplastamiento modificado esencialmente como se describe en Tomczak et al., 2003, *supra*.

Una disolución de sacarosa al 30% (p/v) se suplementó con 100 mg/l de aislado de proteína de suero de leche (WPI – Mullins whey) como control o 4000, 80 y 20 nM de AFP19 de *Aspergillus niger* preparada según el Ejemplo 2. Para este experimento se disolvieron 23 mg de AFP19 en 4,6 ml de agua destilada y de esta disolución se hicieron diluciones 50, 2500, 10000 veces en la disolución de sacarosa al 30%.

10 microlitros de estas disoluciones se usaron para la preparación de las muestras microscópicas y se montaron en un microscopio Zeiss Axiophot equipado con una etapa de enfriamiento. La formación de imágenes se realizó usando una cámara CCD equipada en el microscopio. La ampliación fue de 6,3 veces y la formación de cristal en las muestras se siguió en el tiempo. Primero las muestras se enfriaron a una velocidad de 90°C por segundo hasta -60°C. Después de esto las muestras se calentaron a la misma velocidad hasta -6°C y la formación de cristal de hielo se siguió en el tiempo. Después de 0, 3, 9 y 60 minutos se tomaron fotografías y se usaron para la medida del tamaño de cristal de hielo promedio usando software Linksys32 (Linkam Scientific Instruments). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 1 que muestra claramente que la AFP19 inhibe la recrystalización de hielo. No podría detectarse crecimiento de cristales de hielo en el tiempo incluso cuando la concentración de AFP19 es solo de 20 nM. La muestra de control con WPI muestra sin embargo un claro aumento en el tamaño del cristal en el tiempo.

Estos resultados muestran que el punto final de IR en sacarosa al 30% para AFP19 es claramente menor que 20 nM. Este valor es mucho menor que el punto final de IR presentado para la AFP tipo III de zoarcas (Tomczak et al., 2003, *supra*: 780 nM). Por consiguiente, AFP19 es mucho más efectiva que la AFP tipo III HPLC12 estándar de la industria actual en la inhibición de la recrystalización del hielo.

Tabla 1: Tamaño mínimo y máximo [micrómetro] de cristales de hielo en el tiempo

	T=3 min	T=9 min	T=60 min
control	8-10	15-93	24-185
AFP19 4000 nM	5-11	6-9	4-13
AFP19 80 nM	8-25	9-29	10-30
AFP19 20 nM	8-27	7-29	7-33

Ejemplo 7: Hielo de sorbete producido con AFP19 de *Aspergillus niger*

Se produjo sorbete mezclando 100 gramos de azúcar, 400 ml de agua y 60 gramos de zumo de limón. La proteína de control (WPI) o AFP19 de *Aspergillus niger* preparada según el Ejemplo 2 se añadió a 40 o 400 nM. El sorbete se produjo procesando lotes de 560 g de esta mezcla en una máquina de fabricación de helados de mesa Gel5 (CRM/Telme) con configuraciones estándar. Después de la producción el sorbete se sacó de la máquina y se congeló instantáneamente y se almacenó en porciones de 100 gramos a -30°C durante la cantidad de días necesarios antes del análisis (máximo 4 semanas).

Ejemplo 8: Análisis sensorial de los sorbetes producidos con AFP19 de *Aspergillus niger*

Las porciones de sorbetes como se describen en el Ejemplo 7 se sacaron del congelador 15 minutos antes de la evaluación y se dejaron calentar a temperatura ambiente. El análisis sensorial se realizó mediante un panel que consistía en 5 personas y los sorbetes se evaluaron para capacidad para coger una cucharada, color, sensación en boca, sabor y apariencia general. Todos los asesores estuvieron de acuerdo en que ambos sorbetes hechos con AFP19 de *Aspergillus niger* preparados según el Ejemplo 2 fueron significativamente diferentes de los sorbetes de control. Se encontró a los sorbetes de AFP19 más blancos en apariencia, más firmes al coger una cucharada y que tenían una sensación en boca más suave en comparación con los sorbetes de control. No se encontraron diferencias significativas en la percepción del sabor.

Ejemplo 9: Comportamiento de fusión de los sorbetes producidos con AFP19 de *Aspergillus niger*

Los sorbetes producidos en el Ejemplo 6 se dejaron fundir a una temperatura controlada de 25°C sobre un tamiz de malla de 1 mm. El fundido se recogió y el peso se midió continuamente en una balanza. Los resultados de este experimento pueden verse en la Figura 4. Una diferencia clara en el comportamiento de fusión se vio entre los sorbetes hechos con AFP19 de *Aspergillus niger* preparados según el Ejemplo 2 y los sorbetes de control. Los

sorbetes hechos con AFP19 permanecen congelados durante un periodo mayor de tiempo. Este efecto se observó en AFP19 tanto a 40 como a 400 nM.

Ejemplo 10: Helado producido con AFP19 de *Aspergillus niger*

Se produjo helado mezclando:

Crema de leche	286 g
Polvo de leche desnatada	206 g
Azúcar	240 g
Jarabe de glucosa	80 g

5 Fabricación de un total de 2 kg usando agua caliente.

La mezcla se pasteurizó calentando en un baño de agua ajustado a 95°C durante 30 min. La mezcla se enfrió y se maduró durante 16 h a 4°C. La mezcla se homogeneizó y se filtró antes de la separación en 3 porciones de 650 g; un control sin adiciones, una porción obtenida de AFP19 40 nM de *Aspergillus niger* preparada según el Ejemplo 2, y una porción obtenida de AFP19 400 nM de *Aspergillus niger* preparada según el Ejemplo 2. Se produjo helado procesando los lotes en una máquina de fabricación de helado de mesa Gel5 (CRM/Telme) en configuraciones estándar. Después de la producción el helado se quitó de la máquina y se congeló instantáneamente y se almacenó en porciones de 100 gramos a -30°C durante la cantidad de días necesaria antes del análisis (máximo 4 semanas).

El análisis sensorial del helado producido con AFP19 dio por resultado las mismas conclusiones que se describen para la producción de sorbete helado en el Ejemplo 8: ambos helados hechos con AFP19 fueron más firmes al coger una cucharada y tuvieron una sensación en boca más suave en comparación con el helado de control.

Ejemplo 11: Comportamiento de fusión del helado producido con AFP19 de *Aspergillus niger*

Los helados producidos en el Ejemplo 10 se dejaron fundir a una temperatura controlada de 25°C sobre un tamiz de malla de 1 mm. El fundido se recogió y el peso se midió de forma continua en una balanza. Los resultados de este experimento pueden verse en la Figura 5. Una clara diferencia en el comportamiento de fusión se vio entre el helado hecho con AFP19 de *Aspergillus niger* preparado según el Ejemplo 2 y el helado de control. El helado hecho con AFP19 permanece helado durante un periodo mayor de tiempo. Este efecto se observó en el AFP19 tanto a 40 como a 400 nM, que fue mucho menor que la dosis recomendada en el helado (7 µM) para la AFP tipo III HPLC12 de zoarcas (Lewis, 2006 *supra*).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Proteína estructuradora del hielo

<130> 30016-WO-PCT

5 <140> EP13195351.5

<141> 2013-12-02

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 261

<212> PRT

<213> Leucosporidium

<400> 1

Met Ser Leu Leu Ser Ile Ile Thr Ile Gly Leu Ala Gly Leu Gly Gly
1 5 10 15

Leu Val Asn Gly Gln Arg Asp Leu Ser Val Glu Leu Gly Val Ala Ser
20 25 30

Asn Phe Ala Ile Leu Ala Lys Ala Gly Ile Ser Ser Val Pro Asp Ser
35 40 45

Ala Ile Leu Gly Asp Ile Gly Val Ser Pro Ala Ala Ala Thr Tyr Ile
50 55 60

Thr Gly Phe Gly Leu Thr Gln Asp Ser Ser Thr Thr Tyr Ala Thr Ser
65 70 75 80

Pro Gln Val Thr Gly Leu Ile Tyr Ala Ala Asp Tyr Ser Thr Pro Thr
85 90 95

Pro Asn Tyr Leu Ala Ala Ala Val Ala Asn Ala Glu Thr Ala Tyr Asn
100 105 110

Gln Ala Ala Gly Phe Val Asp Pro Asp Phe Leu Glu Leu Gly Ala Gly
115 120 125

Glu Leu Arg Asp Gln Thr Leu Val Pro Gly Leu Tyr Lys Trp Thr Ser
130 135 140

Ser Val Ser Val Pro Thr Asp Leu Thr Phe Glu Gly Asn Gly Asp Ala
145 150 155 160

ES 2 706 742 T3

Thr Trp Val Phe Gln Ile Ala Gly Gly Leu Ser Leu Ala Asp Gly Val
165 170 175

Ala Phe Thr Leu Ala Gly Gly Ala Asn Ser Thr Asn Ile Ala Phe Gln
180 185 190

Val Gly Asp Asp Val Thr Val Gly Lys Gly Ala His Phe Glu Gly Val
195 200 205

Leu Leu Ala Lys Arg Phe Val Thr Leu Gln Thr Gly Ser Ser Leu Asn
210 215 220

Gly Arg Val Leu Ser Gln Thr Glu Val Ala Leu Gln Lys Ala Thr Val
225 230 235 240

Asn Ser Pro Phe Val Pro Ala Pro Glu Val Val Gln Lys Arg Ser Asn
245 250 255

Ala Arg Gln Trp Leu
260

<210> 2

<211> 786

<212> ADN

5 <213> Leucosporidium

<400> 2

atgagccttc tctccatcat caccattggt cttgctggct tgggtggtct ggtcaacggc	60
cagcgtgacc tctccgttga gcttgagatt gcctccaact tcgccatcct ggccaaggcc	120
ggtatctcct ccgtgcctga ctctgccatc ctcggtgaca tcggtgtctc tcctgctgct	180
gccacctaca tcaccggctt cggctctacc caggacagca gcaccaccta cgccacctcg	240
ccccagggtca ctggtctcat ctacgctgcc gactacagca ctcccacccc caactacctg	300
gctgctgctg ttgccaacgc cgagactgcc tacaaccagg ctgctggctt cgtcgacccc	360
gacttcctgg agcttggtgc tggtagctg cgtgaccaga ctctggtgcc tggctctctac	420
aagtggacct cctccgtctc cgcttctact gacttgacct tcgagggcaa cggcgatgcc	480
acctgggtgt tccagattgc tgggtggtctc tccctcgccg atggtgttgc tttcaccctg	540
gctggtggtg ccaactcgac caacattgct ttccaggctg gcgatgatgt cactgtcggc	600
aagggtgctc acttcgaggg tgctctcctt gccaaagcgt tcgtcacct ccagactggc	660
tcttctctga acggccgtgt cctgagccag accgaggttg ctctccagaa ggccaccgtc	720
aactctcct tcgtccccgc tcccgaggtt gtgcagaagc gctccaacgc ccgccagtgg	780
ctataa	786

<210> 3

<211> 1059

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un fragmento de ADN (que comprende la casete de expresión como en la SEQ ID NO: 3) que contiene entre otros parte del promotor del glucoamilasa y el gen que codifica la ISP

<400> 3

agagcttgaa	gtggcgagat	gtctctgcag	gaattcaagc	tagatgctaa	gcgatattgc	60
atggcaatat	gtgttgatgc	atgtgcttct	tccttcagct	tcccctcgtg	cagatgaggt	120
ttggctataa	attgaagtgg	ttggctcggg	ttccgtgagg	ggctgaagtg	cttcctccct	180
tttagacgca	actgagagcc	tgagcttcat	cccagcatc	attacaccgt	caaatgagc	240
cttctctcca	tcatacccat	tggctctgct	ggcttgggtg	gtctgggtcaa	cggccagcgt	300
gacctctccg	ttgagcttgg	agttgcctcc	aacttcgcca	tcctggccaa	ggcgggtatc	360
tcctcgtgc	ctgactctgc	catactcggt	gacatcgggtg	tctctcctgc	tgctgccacc	420
tacatcaccg	gcttcgggtct	caccagggac	agcagcacca	cctacgccac	ctcgccccag	480
gtcactggtc	tcactctacgc	tgccgactac	agcactccca	cccccaacta	cctgggtgct	540
gctgttgcca	acgcogagac	tgccctacaac	caggctgctg	gcttcgtcga	ccccgacttc	600
ctggagcttg	gtgctggtga	gctgcgtgac	cagactctgg	tgcttgggtct	ctacaagtgg	660
acctcctccg	tctccgttcc	tactgacttg	accttcgagg	gcaacggcga	tgccacctgg	720
gtgttccaga	ttgctgggtg	tctctccctc	gccgatgggtg	ttgctttcac	cctgggtggt	780
ggtgccaact	cgaccaacat	tgctttccag	gtcggcgatg	atgtcactgt	cggcaaggggt	840
gctcacttcg	aggggtgtcct	ccttgccaag	cgcttcgtca	ccctccagac	tggctcttct	900
ctgaacggcc	gtgtcctgag	ccagaccgag	gttgctctcc	agaaggccac	cgtcaactct	960
cccttcgtcc	ccgctcccga	ggttgtgcag	aagcgtccca	acgcccgcga	gtggctataa	1020
5	attaattaac	aatcaatcca	tttcgctata	gttaaagga		1059

REIVINDICACIONES

1. Una célula huésped fúngica filamentosa que comprende un constructo de ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un constructo de ácido nucleico, en la que la célula huésped fúngica filamentosa es del género *Aspergillus*, y en la que dicho constructo de ácido nucleico comprende:
- 5 Una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína estructuradora del hielo (ISP) que comprende la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos idéntica al 80% a ella; y, unida a ella de forma operable,
- 10 Secuencias de control que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped fúngica filamentosa del género *Aspergillus*.
- 15 2. La célula huésped fúngica filamentosa según la reivindicación 1, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica una ISP que comprende la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a ella o que comprende la secuencia presentada en aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a ella.
- 20 3. La célula huésped fúngica filamentosa según la reivindicación 1 o 2, en la que el ácido nucleico codifica una ISP que tiene una secuencia de aminoácidos obtenible de una levadura antártica del género *Leucosporidium*.
- 20 4. La célula huésped fúngica filamentosa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las secuencias de control comprenden un promotor no asociado de forma nativa con el ácido nucleico que codifica una ISP.
- 25 5. La célula huésped fúngica filamentosa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el ácido nucleico se optimiza en pares de codones para la expresión en la célula huésped fúngica filamentosa.
- 25 6. La célula huésped fúngica filamentosa según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la célula huésped fúngica filamentosa es un *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.
- 30 7. Un método para la producción de una proteína estructuradora del hielo (ISP), cuyo método comprende:
 - proporcionar una célula huésped fúngica filamentosa del género *Aspergillus* según cualquiera de las reivindicaciones precedentes;
 - cultivar la célula huésped fúngica filamentosa bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína estructuradora del hielo; y, opcionalmente
 - 30 - recuperar la proteína estructuradora del hielo.
- 35 8. El método según la reivindicación 7, en el que la célula huésped fúngica filamentosa es una célula huésped fúngica filamentosa según la reivindicación 6.
- 35 9. El método según la reivindicación 7 a 8, en el que la ISP se secreta de la célula huésped.
- 35 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la ISP se produce en una cantidad de al menos 1 g/l.
- 40 11. Una proteína estructuradora del hielo que comprende la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica al menos al 80% a ella o que comprende la secuencia presentada en los aminoácidos 21 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica al menos al 80% a ella, en la que:
 - 40 Al menos un aminoácido es un aminoácido modificado y en la que el aminoácido es un piroglutamato presente en el extremo amino.
- 40 12. Una composición alimenticia que comprende la proteína estructuradora del hielo según la reivindicación 11.
- 45 13. Un método para la preparación de un producto alimenticio, cuyo método comprende combinar la proteína estructuradora del hielo según la reivindicación 11 con uno o más ingredientes alimenticios.
- 45 14. El uso de la proteína estructuradora del hielo según la reivindicación 11 en una composición alimenticia.
- 45 15. La composición alimenticia según la reivindicación 12, el método según la reivindicación 13 o el uso según la reivindicación 14, en la que la composición alimenticia es un producto de confitería congelado, tal como un helado o un sorbete.

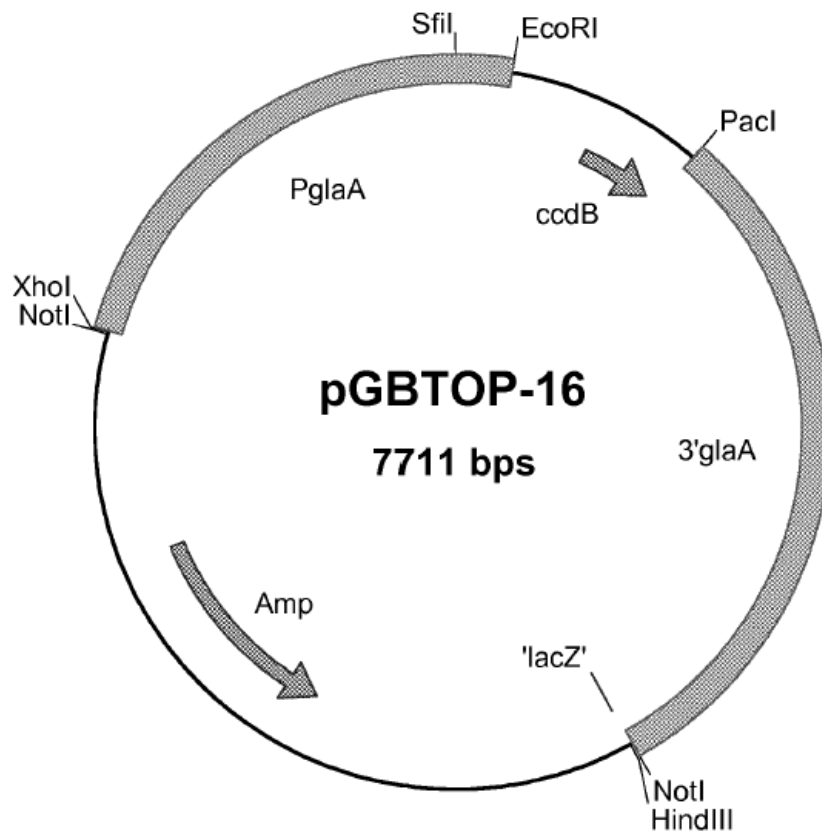


Fig. 1

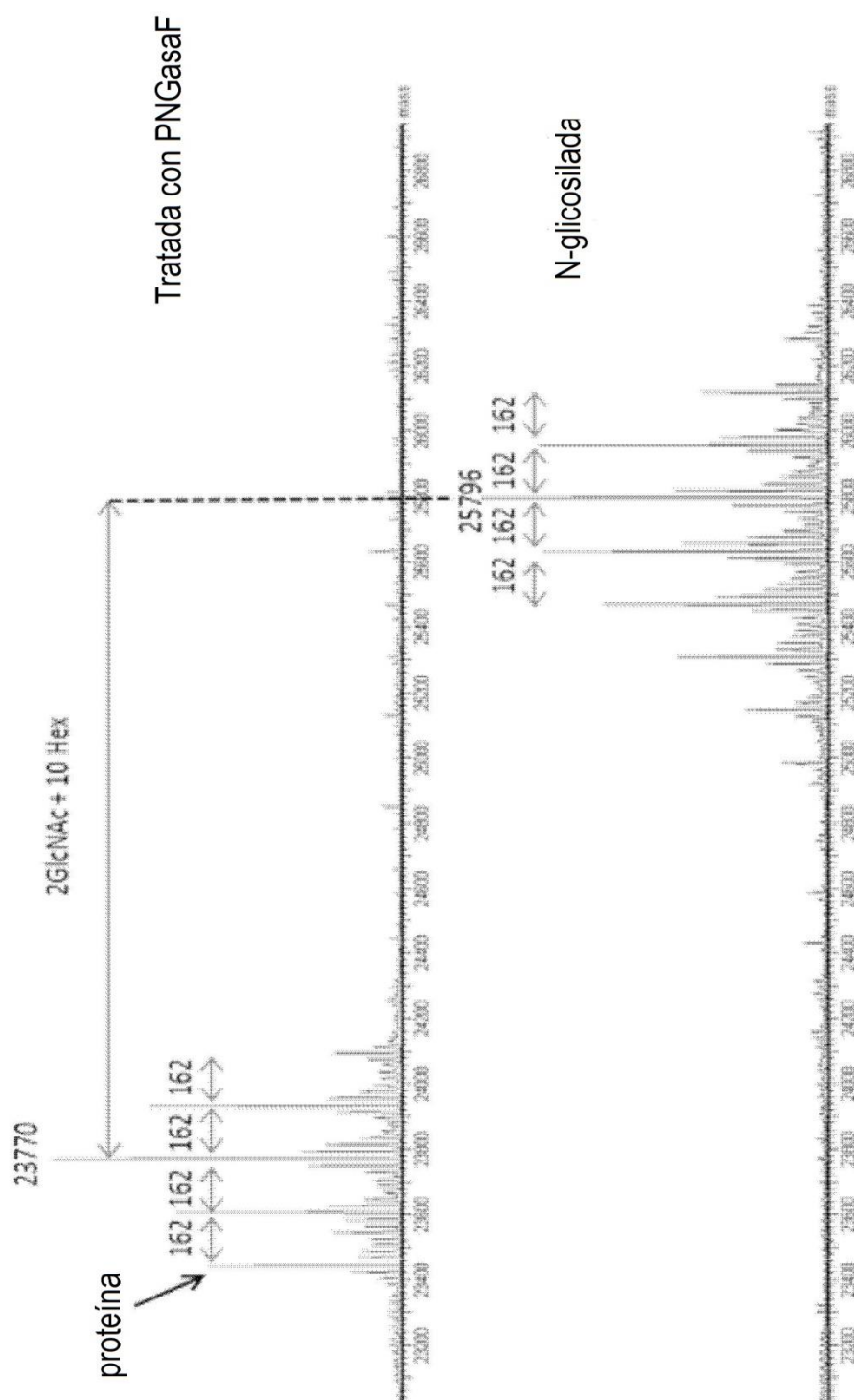


Fig. 2

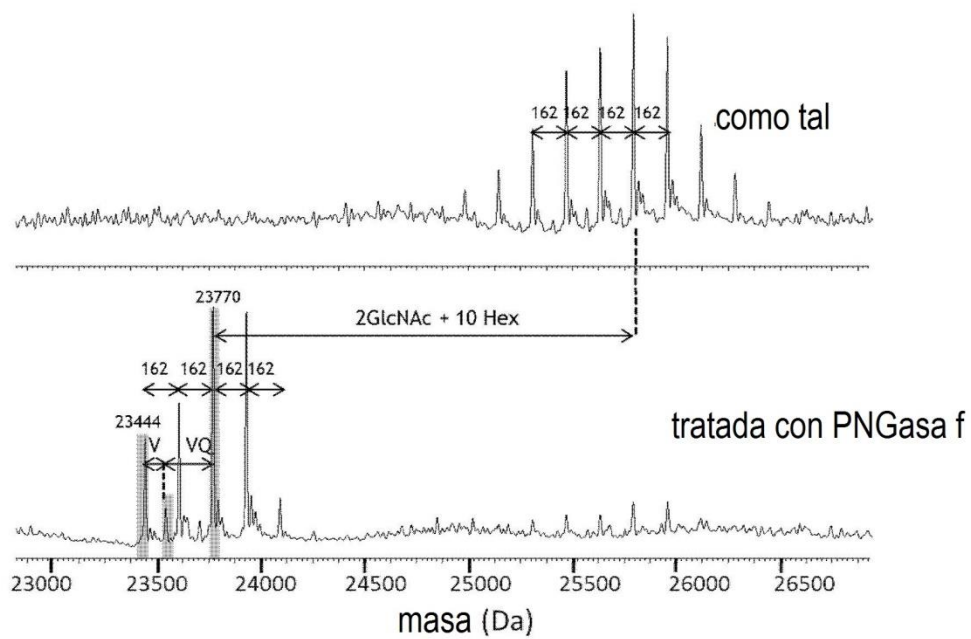


Fig. 3

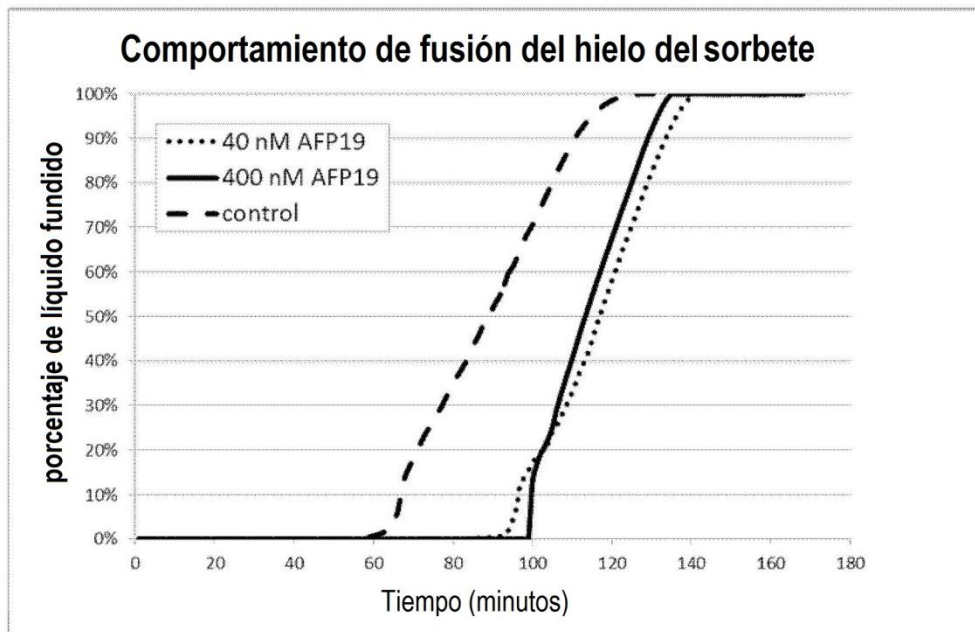


Fig. 4

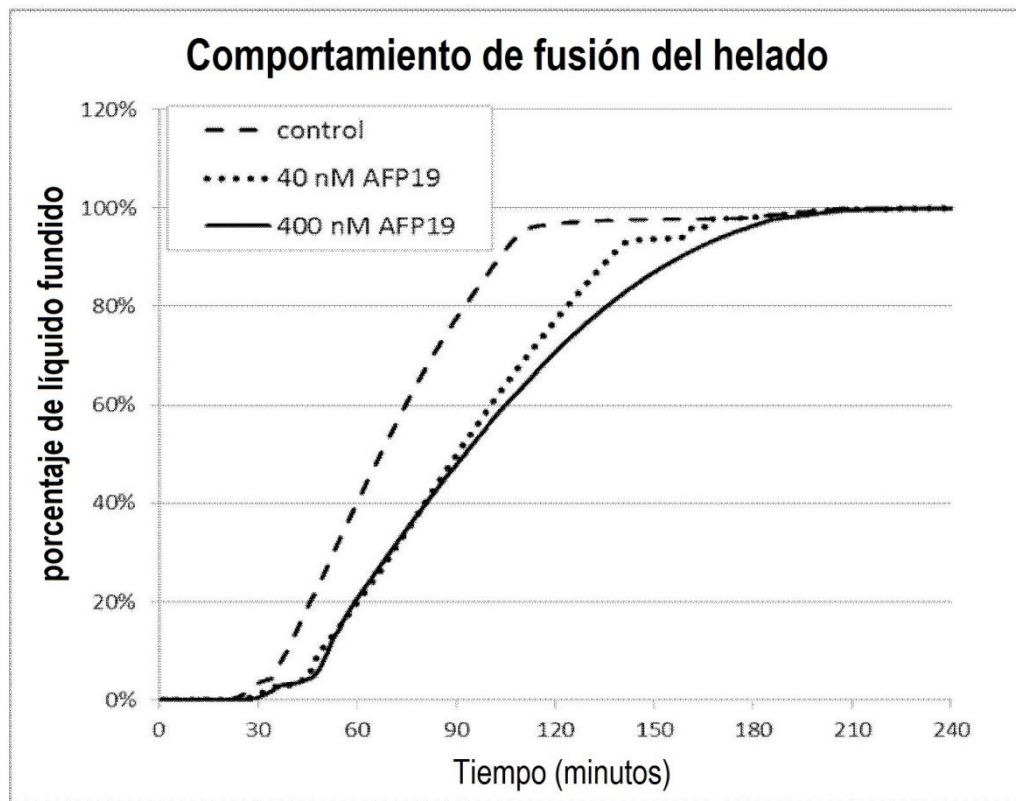


Fig. 5