



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 255 847**

② Número de solicitud: 200402994

⑤ Int. Cl.

**C12N 9/26** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C07H 3/06** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **16.12.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2006**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.07.2006**

⑰ Solicitante/s:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad Autónoma de Madrid**

⑱ Inventor/es: **Fernández Lobato, María;  
Marín Alberdi, Dolores;  
Jiménez Martínez, Antonio;  
Plou Gasca, Francisco José;  
Gómez de Segura Ugalde, María Aranzazu y  
Alcalde Galeote, Miguel**

⑳ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑳ Título: **Nueva enzima para la obtención de oligosacáridos prebióticos.**

㉑ Resumen:

Nueva enzima para la obtención de oligosacáridos prebióticos.

Se proporciona un procedimiento de obtención de oligosacáridos prebióticos viable industrialmente que utiliza una nueva enzima de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, caracterizada por presentar actividad  $\alpha$ -glucosidasa. También se proporciona un procedimiento de obtención de un producto enzimático con actividad  $\alpha$ -glucosidasa, así como de la enzima sustancialmente pura con actividad  $\alpha$ -glucosidasa. El producto enzimático y la enzima presentan como aspectos positivos un alto espectro de actuación y una alta actividad específica. Los oligosacáridos prebióticos se usan en alimentación.

ES 2 255 847 A1

## DESCRIPCIÓN

Nueva enzima para la obtención de oligosacáridos prebióticos.

5 Esta invención se relaciona con el campo de la industria biotecnológica y, en particular, con el sector agroalimentario dedicado a la obtención de oligosacáridos prebióticos para ser utilizados como ingredientes funcionales en productos dietéticos, productos lácteos, alimentos infantiles y alimentos para animales. También se relaciona con el campo de la industria farmacéutica y cosmética.

10 **Estado de la técnica**

Los hidratos de carbono, el material biológico más abundante en la naturaleza, se utilizan como elementos de partida en una gran variedad de procesos industriales; por ello, las enzimas implicadas en su metabolismo tienen un enorme interés, tanto desde un punto de vista básico como tecnológico.

15 El campo de los oligosacáridos prebióticos como ingredientes funcionales en alimentación se ha desarrollado de manera espectacular en los últimos años. El término prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid, quienes definieron a los prebióticos como ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un limitado grupo de bacterias en el colon. 20 Los oligosacáridos prebióticos son fundamentalmente los fructooligosacáridos (FOS), aunque también tienen gran aplicación los isomaltooligosacáridos (IMOS) y los transgalactooligosacáridos (GalOS). Los efectos de los prebióticos sobre la persona que los consume pueden ser muy variados: reducción de los episodios de diarreas causadas por rotavirus; mejora de los síntomas de la intolerancia a la lactosa; control del estreñimiento por aumento de la masa fecal; aumento de la absorción de calcio, y en consecuencia una reducción del riesgo de osteoporosis; disminución de 25 la capacidad mutagénica de ciertas enzimas microbianas como la nitro-reductasa, asociadas con el cáncer de colon; posible reducción de enfermedades relacionadas con dislipemias, etc.

Los isomaltooligosacáridos (IMOS) son azúcares formados por unidades de glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1,6, aunque los productos que se comercializan también contienen oligosacáridos formados por glucosas unidas por 30 enlaces  $\alpha$ -1,6 y  $\alpha$ -1,4, como el trisacárido panosa. El interés de los IMOS radica en sus propiedades prebióticas, además de mejorar las características higroscópicas y reológicas de los productos a los que se incorporan. Afortunadamente estas interacciones son muy selectivas: los IMOS son específicamente metabolizados por la microflora bacteriana beneficiosa (géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*), favoreciendo el crecimiento de estos microorganismos, sin presentar ningún tipo de interacción con la microflora potencialmente patógena (efecto bífido). 35 También tienen aplicación para la prevención de la caries (al inhibir la síntesis de glucanos por parte de *Streptococcus mutans* y especies relacionadas) y como sustancias inmunoestimuladoras.

Los maltooligosacáridos son azúcares que tienen típicamente entre 2 y 7 unidades de glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ -1,4 ( $[\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)]<sub>2,7</sub>). Su ingestión mejora el estado del colon en el hombre; el consumo de jarabes ricos en maltotetraosa ( $[\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)]<sub>4</sub>) reduce los niveles intestinales de *Clostridium perfringens* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. No obstante, y dado que normalmente son hidrolizados por las enzimas digestivas tras su ingestión, no pueden considerarse prebióticos estrictos. Los maltooligosacáridos tienen una serie de propiedades (alta solubilidad, viscosidad elevada, bajo poder endulzante, no son higroscópicos, etc.) que les proporcionan un gran número de aplicaciones en alimentación. Entre ellas destacan su uso como aglomerantes, sustitutos de grasas, 45 aportadores de textura, o espesantes (cfr. F. Barresi *et al.*, "Maltooligosaccharides from corn", *Oligosaccharides in food and agriculture*, G. Eggleston and G.L. Cote, eds., ACS Symposium Series, 2003, vol. 849, pp. 182-95).

Los oligosacáridos prebióticos se obtienen comúnmente a nivel industrial por síntesis enzimática, empleando glicosiltransferasas o glicosidasas. Los IMOS se producen a partir de almidón utilizando dos etapas enzimáticas. En la primera el almidón es parcialmente degradado por la acción de una  $\alpha$ -amilasa, obteniendo maltooligosacáridos. En la segunda etapa, los maltooligosacáridos son convertidos en isomaltooligosacáridos por la acción conjunta de una beta-amilasa, que degrada a maltosa las maltodextrinas formadas, y una  $\alpha$ -glucosidasa, que forma por transferencia enlaces  $\alpha$ -1,6 (cfr. T. Kaneko *et al.*, "Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal bifidobacteria", *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994, vol. 58, pp. 2288-90). Las enzimas procedentes de *Aspergillus niger* y *Bacillus stearothermophilus* se utilizan actualmente para la obtención de oligosacáridos prebióticos (cfr. respectivamente K.J. Duan *et al.*, "Transglucosylation of a fungal  $\alpha$ -glucosidase - The enzyme properties and correlation of isomaltooligosaccharide production", *Ann. New York Acad. Sci.* 1995, vol. 750, pp. 325-8; S. Mala *et al.*, "Towards regioselective synthesis of oligosaccharides by use of  $\alpha$ -glucosidasas with different substrate specificity", *Carbohydr. Res.* 1999, vol. 322, pp. 209-18). 55

60 La producción anual de oligosacáridos prebióticos supera las 10.000 toneladas y tiene lugar principalmente en el Japón. Un producto típico comercial (Isomalto-900), fabricado por Showa Sangyo Co., es un jarabe que contiene un 75% (p/v) de sólidos, de los cuales más del 85% corresponde a oligosacáridos (cfr. R.G. Crittenden *et al.*, "Production and applications of food-grade oligosaccharides" *Trends Food Sci. Technol.* 1996, vol. 7, pp. 353-61). Dada la importancia industrial de los oligosacáridos prebióticos, es deseable proporcionar enzimas y procedimientos para su 65 obtención que sean viables industrialmente.

## Explicación de la invención

Los inventores han encontrado una nueva enzima de *Xanthophyllomyces dendrorhous* caracterizada por presentar actividad  $\alpha$ -glucosidasa y útil para la obtención de oligosacáridos. Así, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un producto enzimático con actividad  $\alpha$ -glucosidasa, que comprende cultivar células de *X. dendrorhous* en un medio y condiciones apropiados. Mediante métodos convencionales, el experto en la materia escogerá los medios de cultivo y las condiciones como pH, temperatura y agitación para el cultivo de *X. dendrorhous*. Ejemplos de cultivo se describen en detalle más adelante.

Una  $\alpha$ -glucosidasa (EC 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glucósido glicosil-hidrolasa, según la IUBMB Enzyme Nomenclature, CAS Registry Number 9001-42-7) actúa sobre los extremos no reductores de un variado número de glúcidos produciendo la liberación sucesiva de unidades de D-glucosa.

El producto enzimático crudo resultado del procedimiento de la invención ya puede ser utilizado industrialmente para la obtención de oligosacáridos sin requerir etapas de separación o purificación posteriores. De todas formas, en una realización particular de la invención, el procedimiento comprende además el paso de recuperar el producto enzimático del medio de cultivo y/o de las células, pues la enzima objeto de la invención se libera extracelularmente. Así se entiende como producto enzimático en esta descripción tanto la suspensión de células de *X. dendrorhous* con el medio de cultivo apropiado para que se haya expresado la actividad  $\alpha$ -glucosidasa, como la fracción libre de células. Mediante métodos convencionales, el experto en la materia escogerá el producto enzimático de partida más apropiado a cada procedimiento industrial, es decir, crudo o con más o menos nivel de purificación.

En otra realización particular de la invención las células de *X. dendrorhous* pertenecen a una cepa seleccionada del grupo que consiste en ATCC:MYA-131, ATCC 24230, CECT 11028 y CECT 1690 (CECT corresponde a la Colección Española de Cultivos Tipo en Burjassot, Valencia). Se incluye más adelante una descripción detallada del organismo *X. dendrorhous*. La cepa ATCC: MYA-131 ha sido depositada en la Colección de Cultivos Tipo Americana (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852, USA). Se designó como UCD67-210 y se catalogó como ATCC: MYA-131.

Otro aspecto de la invención se refiere al producto enzimático con actividad  $\alpha$ -glucosidasa obtenible por el procedimiento definido anteriormente. El producto enzimático de la invención es muy eficiente en la degradación de maltosa y oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4 (p. ej. maltotriosa, maltoheptosa) y actúa también sobre polisacáridos como las maltodextrinas y el almidón soluble. En una realización particular de la invención, el producto enzimático de la invención se caracteriza porque la actividad  $\alpha$ -glucosidasa tiene baja especificidad de sustrato, actuando sobre maltosa, maltotriosa, maltoheptosa, dextrinas, X- $\alpha$ -glucósido, glucógeno y almidón soluble. En otra realización particular de la invención, el producto enzimático no tiene actividad  $\alpha$ -glucosidasa sobre isomaltosa, isomaltotriosa, pululan y dextrano. En otra realización particular, la actividad  $\alpha$ -glucosidasa del producto enzimático presenta un máximo en el intervalo de pH entre 4.5 y 6.0 a 42°C, y en un intervalo de temperatura entre 40 y 50°C.

La formación de un nuevo enlace glicosídico, que tiene lugar en una reacción de transferencia (transglicosilación), y la hidrólisis de ese mismo enlace son dos variantes de un mismo proceso catalítico. Así, algunas enzimas glucosidasas son capaces de catalizar tanto la formación de un enlace glicosídico como su hidrólisis, y su actividad en uno u otro sentido depende en gran medida de las condiciones fisiológicas en las que actúan *in vivo*, o del control termodinámico o cinético que se ejerza *in vitro*. Las glicosiltransferasas (EC 2.4) son enzimas que catalizan la transferencia de unidades de azúcar de moléculas dadoras activadas a moléculas aceptoras específicas, formando enlaces glicosídicos.

Los inventores han encontrado que además de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa, el producto enzimático de la invención tiene actividad glicosiltransferasa en presencia de uno o varios sustratos glucídicos, en particular maltooligosacáridos (p.ej. maltosa en altas concentraciones). En una realización particular, los productos resultantes de la actividad glicosiltransferasa son oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4, en particular maltotriosa y maltotetraosa; oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,6, en particular, isomaltosa; y/o oligosacáridos mixtos con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, en particular, panosa y el tetrasacárido  $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de una enzima sustancialmente pura con actividad  $\alpha$ -glucosidasa, que comprende los pasos de: (a) obtener un producto enzimático con actividad  $\alpha$ -glucosidasa mediante el cultivo de células de *X. dendrorhous* en un medio y condiciones apropiados; (b) recuperar el producto enzimático del medio de cultivo y/o de las células; y (c) purificar el producto enzimático hasta obtener una enzima sustancialmente pura con actividad  $\alpha$ -glucosidasa. En una realización particular de la invención, las células de *X. dendrorhous* pertenecen a una cepa seleccionada del grupo que consiste en ATCC:MYA-131, ATCC 24230, CECT 11028 y CECT 1690. La invención también se refiere a una enzima sustancialmente pura con actividad  $\alpha$ -glucosidasa obtenible por el procedimiento definido. Los métodos de purificación convencionales podrán utilizarse para obtener la enzima de la invención. Un ejemplo de método de purificación se describe en detalle en esta descripción.

Las características indicadas de especificidad de sustrato para el producto enzimático de la invención se atribuyen también a la enzima purificada. La actividad glicosiltransferasa también es característica de la enzima purificada. Además, en una realización particular, la enzima se caracteriza por tener un peso molecular determinado por filtración molecular de aproximadamente 115 kDa, y un punto isoelectrico de aproximadamente 5.5. Los inventores han carac-

terizado la enzima purificada cinéticamente y por espectrometría de masas. Estos datos se incluyen más adelante en esta descripción.

Algunos aspectos positivos del producto enzimático y de la enzima de la invención, son que presentan un alto espectro de actuación y una alta actividad específica, convirtiéndolos en candidatos idóneos para hidrolizar o modificar oligosacáridos. Otro aspecto importante a nivel industrial es que el producto enzimático y la enzima son estables durante largos tiempos de reacción (p.ej. 300 h) a una temperatura de aproximadamente 40°C como se ilustra en la descripción detallada que viene a continuación.

La presente invención conlleva un procedimiento de obtención de oligosacáridos viable industrialmente. Así, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de oligosacáridos que comprende permitir que el producto enzimático o la enzima purificada, definidos anteriormente, actúen sobre uno o varios sustratos glucídicos. Mediante métodos convencionales, el experto en la materia escogerá los medios de cultivo, los sustratos y las condiciones de reacción para llevar a cabo el procedimiento. Además, la enzima o las células de *X. dendrorhous*, productoras de la enzima, pueden usarse como tal o de manera inmovilizada, acopladas física o químicamente a un material portador. De esta manera se permite la reutilización de la enzima o las células. Ejemplos de preparación se incluyen más adelante en esta descripción.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. La siguiente descripción detallada, ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 25 Descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la producción de actividad  $\alpha$ -glucosidasa extracelular a lo largo del cultivo de *X. dendrorhous*. La levadura se creció en Medio Mínimo Maltosa a 24°C y agitación orbital constante de 160 rpm durante 175 horas. Se representa el crecimiento del cultivo en UDO 660 nm (cuadrados) y la actividad  $\alpha$ -glucosidasa valorada en el medio extracelular, en U/ml (triángulos), alcanzada a los tiempos que se indican. La actividad se ensayó sobre maltosa al 1%.

La Fig. 2 es el resultado del análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de la proteína purificada a homogeneidad. Se muestra la intensidad relativa (r.i.) de los péptidos tríficos ionizados frente a la masa/carga (m/z) de los mismos. El sobrenadante de la digestión con tripsina se analizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF modelo Autoflex de Bruker equipado con reflector, empleando HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) como matriz en condiciones de saturación.

La Fig. 3 muestra la actividad de la Fracción F-3 de *X. dendrorhous* sobre almidón (Paselli SA2, Avebe, con un grado de polimerización medio de 50 unidades de glucosa). Los ensayos se realizaron utilizando proteína purificada y una concentración de sustrato del 10% (p/v) en tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.4. Se muestra un cromatograma de una mezcla de oligosacáridos desde G1 (glucosa) hasta G7 (maltoheptosa). Los cromatogramas de la reacción de hidrólisis de almidón corresponden a los siguientes tiempos de reacción: I, tiempo 0; II, 15 horas; III, 63 horas; IV, 168 horas.

La Fig. 4 indica la actividad enzimática (A) en función del pH y de la temperatura, mostrando los máximos correspondientes. Fig. 4A: Se valoró la actividad  $\alpha$ -glucosidasa a distintos pH (3-7 unidades pH) y temperaturas (25-60°C). El ensayo se realizó sobre maltosa utilizando una solución de proteína pura. El 100% se corresponde con una actividad de 100 U/ml. En la valoración de pH se utilizó una temperatura de ensayo de 42°C y tampón citrato o fosfato (50 mM) para los intervalos de pH de 3-4.5 y 5-7 respectivamente. Fig. 4B: El ensayo de temperaturas se realizó en fosfato sódico 50 mM pH 5.5.

La Fig. 5 muestra el perfil de productos obtenidos tras la incubación de maltosa con la enzima purificada (F-3) de *X. dendrorhous*. Las condiciones de reacción, las condiciones de análisis mediante HPLC y los nombres de los compuestos son los mismos que en la TABLA 5. El análisis corresponde a las 143 h de reacción.

## 55 Descripción de *xanthophyllomyces dendrorhous*

La levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (también llamada *Phaffia rhodozyma*) se emplea actualmente en la industria biotecnológica para producir astaxantina, carotenoide que ha demostrado una enorme eficacia en la pigmentación de salmónidos, crustáceos y en avicultura. *X. dendrorhous* acumula de forma natural este caroteno y además de forma libre, lo que facilita la preparación del pigmento. Esto lo convierte en el microorganismo en el que de una manera global la producción es más rentable que en ningún otro. Actualmente se comercializa como “Natupink” por Gist-Brocades (cfr. EP 551676 B1). Hoffman-La Roche (Basle, Suiza) ha comercializado la denominada astaxantina sintética “Carophyll pink”. Antibióticos S.A. ha desarrollado el procedimiento para la producción de astaxantina mediante la fermentación de cepas seleccionadas de *X. dendrorhous* (cfr. ES 2203315 A1).

El atractivo comercial de la astaxantina ha originado un considerable avance en el conocimiento genético-molecular del organismo productor. Se han caracterizado los genes implicados en la producción de la astaxantina, pero también

algunos de los relacionados con la utilización de fuentes de carbono, como los responsables de la síntesis de una endo-beta-1,3(4)-glucanasa, una proteasa (cfr. M.L. Bang *et al.*, "Cloning and characterization of an endo-beta-1,3 (4)-glucanase and aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, vol. 51, pp. 215-22); o la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (cfr. J.C. Verdoes *et al.*, "Molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Phaffia rhodozyma*", *Yeast* 1997, vol. 13, pp. 1231-42). Se ha purificado parcialmente y caracterizado una proteína extracelular de 240 kDa con actividad beta-amilasa (cfr. A. Díaz *et al.*, "Production and partial characterization of a beta-amylose by *Xanthophyllomyces dendrorhous*", *Lett. Appl. Microbiol.* 2003, vol. 36, pp. 203-7). Algunas proteínas, como la invertasa asociada a la fracción celular o la ureasa, también han sido estudiadas en este organismo (cfr. D.S. Persike *et al.*, "Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*)", *Bioresour Technol.* 2002, vol. 82(1), pp. 79-85).

Además de la producción de astaxantina, *X. dendrorhous* se ha indicado para la producción de neokestosa (CAS Registry Number 3688-75-3), un trisacárido prebiótico que se obtiene a partir de sacarosa (cfr. S.M. Kritzinger *et al.*, "The effect of production parameters on the synthesis of the prebiotic trisaccharide, neokestose, by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)", *Enzyme and Microbial Technology* 2003, vol. 32, pp. 728-37).

#### Caracterización enzimática

##### Expresión de actividad $\alpha$ -glucosidasa de *X. dendrorhous* en medios sólidos

La actividad  $\alpha$ -glucosidasa de la levadura se ensayó en medios sólidos utilizando X- $\alpha$ -D-glucósido (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, Glycosynth), elemento que contiene un grupo cromóforo unido mediante un enlace glicosídico a D-glucosa. Se emplearon placas de 20 ml que contenían medio mínimo para levaduras: YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), agar al 2% (p/v), fuente de carbono al 2%, suplementadas con X- $\alpha$ -D-glucósido. Las placas se inocularon con la cepa de *X. dendrorhous* MYA-131. Se obtuvo un crecimiento positivo del microorganismo cuando se usó maltosa, almidón, glucosa, manosa o fructosa. Se detectó una buena actividad  $\alpha$ -glucosidasa, adquisición de color azul intenso por los microorganismos que expresan esta actividad, en presencia de almidón y maltosa.

30

##### Expresión de la actividad amilásica de *X. dendrorhous*

La levadura se creció en distintos medios suplementados con diferentes fuentes de carbono. Este organismo puede utilizar distintos monosacáridos (glucosa, manosa, y fructosa), y oligosacáridos (maltosa, maltotriosa y sacarosa). La actividad amilolítica de *X. dendrorhous* se testó inicialmente en medio sólido utilizando medios mínimos con almidón (MMA): YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), almidón 2%, agar 2%. El almidón es soluble a temperatura ambiente, pero precipita a 4°C. Cuando un microorganismo expresa una actividad amilásica, la concentración de almidón disminuye alrededor de sus colonias y no se produce precipitación; aparece un halo de hidrólisis. Se obtuvo halo de hidrólisis del polisacárido con las cepas de *X. dendrorhous* ATCC 24230, CECT 11028, CECT 1690 y ATCC: MYA-131.

40

##### Caracterización de la actividad $\alpha$ -glucosidasa de *X. dendrorhous* después del cultivo y centrifugación de la fracción libre de células

La producción de actividad  $\alpha$ -glucosidasa se analizó en cultivos de *X. dendrorhous* crecidos en medio mínimo para levaduras: YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), fuente de carbono al 2%. Los cultivos se realizaron en matraces de vidrio incubados a 24°C y agitación constante de 160 rpm.

45

Se obtuvo la fracción libre de células por centrifugación (F-0) y en ella se ensayó la actividad  $\alpha$ -glucosidasa valorando la liberación de glucosa sobre distintos sustratos. Se usó un ensayo colorimétrico y la metodología estándar. La glucosa liberada se cuantificó utilizando la reacción acoplada de la glucosa oxidasa-peroxidasa: 0.4 ml de la solución a valorar se mezcló con 0.1 ml de solución A:B (20:1) (A: 0.85 U/ml glucosa oxidasa, 0.40 U/ml peroxidasa en tampón fosfato sódico pH 5; B: 0-Dianisidina 0.6%). Se incubó 30 minutos a 37°C y cuantificó espectrofotométricamente a 450 nm. Se utilizó una curva patrón de glucosa (1 a 100  $\mu$ g/ml). La unidad de actividad  $\alpha$ -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 20  $\mu$ g/ml de glucosa en las condiciones descritas. La Fig. 1 muestra los resultados obtenidos cuando se utiliza la cepa MYA-131 y el ensayo se realiza sobre maltosa. Los resultados del ensayo también se muestran en la Tabla 1. No se detectó actividad cuando se utilizó dextrano, isomaltosa e isomaltotriosa como sustrato.

55

60

65

## ES 2 255 847 A1

TABLA 1

*Actividad  $\alpha$ -glucosidasa de la fracción extracelular de X. dendrorhous sobre diferentes polímeros de glucosa*

Sustrato	Actividad específica (U/ $\mu$ g)
maltosa	30
maltotriosa	18
maltoheptosa	24
maltodextrina	21
almidón	23

*Purificación de la enzima con actividad  $\alpha$ -glucosidasa de X. dendrorhous*

En la purificación de la enzima se utilizó el siguiente método y con los resultados resumidos en la Tabla 2.

1°) Concentración de la fracción extracelular de máxima actividad utilizando un sistema de filtración tangencial (filtro de 30 kDa) y diálisis frente a fosfato sódico 20 mM pH 7 (tampón A) durante 3 horas a una temperatura de 4°C (F-1).

2°) Cromatografía de intercambio iónico a pH 7. La muestra se aplicó a una columna de 10 ml de intercambio iónico de DEAE-sephacel equilibrada con tampón A. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M. La fracción eluida a 0.05 M de sal se dializó frente a acetato sódico 20 mM pH 4.5 (tampón B) (F-2).

3°) Cromatografía de intercambio iónico a pH 4.5. La muestra se aplicó a la columna de intercambio iónico DEAE-sephacel equilibrada con tampón B y se eluyó utilizando 0.2 M de NaCl (F-3).

TABLA 2

*Resumen del proceso de purificación de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa de X. dendrorhous y rendimiento obtenido. La actividad enzimática durante el proceso de purificación se determinó utilizando maltosa como sustrato*

	actividad (U totales)	proteína ( $\mu$ g)	rendimiento (%)	act. específica (U/ $\mu$ g)	grado purificación
S.N. (F-0)	37000	1600	100	23	1
concentrado (F-1)	32300	1235	87	26	1.1
DEAE pH 7 (F-2)	20525	457	55	45	19.5
DEAE pH 4.5 (F-3)	14715	14	40	1065	46.1

*Determinación por filtración molecular del peso molecular de la enzima con actividad  $\alpha$ -glucosidasa de X. dendrorhous*

Para determinar el peso molecular de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa se empleó cromatografía de exclusión molecular, utilizando un sistema de cromatografía líquida (HPLC). Se utilizó una columna de 24 ml de Superosa 12 HR10/30 (Pharmacia) equilibrada con 50 ml de fosfato sódico 50 mM pH 7, NaCl 0.15 M a una velocidad de 0.25 ml/min. Se aplicó 0.1 ml de una preparación enzimática con una actividad específica de  $1 \times 10^6$  U/mg sobre maltosa. Se recogieron fracciones de 0.3 ml. Como marcadores de peso molecular se usaron: inmunoglobulina G (160,000 Da), albúmina (67,000 Da), beta-lactoglobulina (35,000 Da) y citocromo C (12,400 Da) que eluyeron a 12, 13.2, 14.42 y 16.64 ml, respectivamente. Todo el proceso se realizó a 4°C. La actividad  $\alpha$ -glucosidasa se ensayó sobre maltosa utilizando la metodología que se describe previamente. Se detectó actividad en la fracción eluida a 12.3 ml, lo que se corresponde con una proteína de  $115 \pm 5\%$  kDa de peso molecular.

La  $\alpha$ -glucosidasa purificada a homogeneidad según el procedimiento descrito tiene un peso molecular calculado por filtración molecular (HPLC y Superosa 12 HR) de  $115 \pm 5\%$  kDa y un punto isoeléctrico ( $p_i$ ) de 5.5.

*Caracterización por espectrometría de masas de la enzima con actividad  $\alpha$ -glucosidasa de X. dendrorhous*

5 La proteína se digirió con tripsina (Tripsina-TPCK Promega) en condiciones de digestión estándar (cfr. A. Shevchenko *et al.*, "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels", *Anal Chem.* 1996 vol. 68(5), pp. 850-8). El sobrenadante de la digestión con tripsina se analizó en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF (matriz-asisted laser desorption ionisation/time-of-flight) modelo Autoflex de Bruker equipado con reflector no lineal, con láser de nitrógeno-UV a 337 nm, con pulsos de 3 nanosegundos, siguiendo la metodología estándar, empleando HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico) como matriz en condiciones de saturación y trifluoroacéticos 0,1% y acetonitrilo 33% (v/v). El resultado obtenido se muestra en la Fig. 2. Este espectro se utilizó como "huella peptídica" para la identificación de proteínas en las bases de datos utilizando los motores de búsqueda (Mascot, Profound) accesibles en red, basándose en la intensidad relativa (r.i.) de los péptidos tríficos ionizados frente a la masa/carga (m/z) de los mismos. La proteína aislada es una nueva molécula nunca antes descrita al no encontrarse perfiles MALDI-TOF coincidentes con proteínas conocidas por su secuencia de aminoácidos, ni la correspondiente deducida por la secuencia de DNA.

*Caracterización de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa de la enzima purificada*

20 La actividad hidrolítica de la enzima purificada a homogeneidad (F-3), siguiendo el procedimiento descrito, se ensayó sobre distintos sustratos. El máximo nivel de actividad se obtiene sobre maltosa, maltoheptosa, almidón soluble (Difco o Sigma) y dextrinas. No se observó actividad sobre dextrano, pululan, isomaltosa e isomaltotriosa. Los resultados obtenidos se recopilan en la Tabla 3.

TABLA 3

*Actividad  $\alpha$ -glucosidasa de la fracción F-3 de X. dendrorhous sobre distintos sustratos. Los ensayos se realizaron utilizando proteína purificada y una concentración para todos los sustratos ensayados del 1%*

30

Sustrato	Actividad específica (U/ $\mu$ g)
maltosa	1172
maltotriosa	647
maltoheptosa	997
maltodextrina	747
almidón (Difco)	947
almidón (Sigma)	222
glucógeno	197

50 El perfil de productos obtenidos en la hidrólisis de almidón se estudió por cromatografía líquida. La Fig. 3 muestra claramente que el producto principal final formado en esta reacción es glucosa.

55 La actividad glucosidasa se ensayó a diferentes pHs y temperaturas. Se obtuvieron niveles máximos de actividad en un rango de pH comprendido entre 4.5 y 6 unidades y una temperatura de 40-50°C. La Fig. 4 muestra los resultados obtenidos.

60 La caracterización cinética de la enzima purificada, según el procedimiento descrito, se realizó sobre maltosa, maltotriosa, maltoheptosa y almidón. Los datos se recopilan en la Tabla 4. Los ensayos se realizaron en 30 minutos y 100 ng de enzima para cada reacción. El peso molecular del almidón, suministrado por Avebe, es de 8100 Da.

65

TABLA 4

Constantes cinéticas de la actividad glicosilhidrolasa de la  $\alpha$ -glucosidasa de *X. dendrorhous*

Sustrato	$V_{\max}$ ( $\mu\text{g}$ glucosa $\text{min}^{-1}$ )	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
maltosa	23	460	2.71	170
maltotriosa	12	240	0.55	436
maltoheptos	15	300	0.86	348
almidón	4.29	85.8	0.88	97.5

Actividad glicosiltransferasa de la enzima de *X. dendrorhous*

Se realizó un estudio utilizando una alta concentración de maltosa (240 g/l), condiciones que pueden favorecer la formación de enlaces glicosídicos en detrimento de la hidrólisis. El perfil de los productos formados se muestra en la Fig. 5. Se puede apreciar que la  $\alpha$ -glucosidasa de *X. dendrorhous* presenta actividad de transferencia. Además, se forman dos familias de productos: oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4 (maltooligosacáridos: maltotriosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu]; maltotetraosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu] y oligosacáridos que contienen algún enlace  $\alpha$ -1,6 (isomaltosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu], panosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu] y el tetrasacárido:  $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu).

En la Tabla 5 se muestra la composición (en g/l) de los azúcares valorados en la mezcla de reacción a lo largo de 288 horas de incubación. La nueva enzima caracterizada en este trabajo sigue manteniendo actividad glicosiltransferasa tras 288 horas a 40°C.

TABLA 5

Composición de la mezcla de reacción con el tiempo tras la incubación de maltosa con la enzima purificada (F-3) de *X. dendrorhous*. Condiciones de reacción: 240 g maltosa/l en 0.2 M acetato sódico (pH 5.4), 40°C, 150 rpm. Análisis mediante HPLC utilizando una bomba Waters delta 500, columna Lichrospher 100-NH2 (Merck) de 250 x 4.6 mm, acetonitrilo:agua 75:25 v/v, 0.7 ml/min, 25°C, detector de índice de refracción Varian. Nombre de los compuestos: 1, glucosa; 2, maltosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu]; 3, isomaltosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu]; 4, maltotriosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu]; 5, panosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu]; 6, maltotetraosa [ $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu]; 7, el tetrasacárido  $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu.

Tiempo de reacción	Composición de la mezcla de reacción (gramos/litro)						
	1	2	3	4	5	6	7
0	0	240.0	0	0	0	0	0
27	24.6	183.4	0	26.3	5.7	0	0
117	47.2	103.0	12.7	42.6	14.7	11.0	8.8
143	51.6	94.4	12.4	42.8	16.1	12.4	10.1
216	60.9	78.1	13.1	39.3	18.9	15.1	14.5
288	66.3	69.2	14.4	35.9	21.2	15.4	17.6

## Ejemplos de preparación

### Ejemplo 1

5 *Producción de  $\alpha$ -glucosidasa a lo largo de un cultivo de X. dendrorhous crecido en medio rico*

Para la producción de  $\alpha$ -glucosidasa, se cultivó *X. dendrorhous* de la cepa ATCC 24230 crecido en 100 ml de medio rico para levaduras (YEP) suplementado con maltosa (YEPM): extracto de levadura (DIFCO) al 1% (p/v), bactopectona (DIFCO) al 2% (p/v), maltosa al 2% (p/v), se siguió durante 60 horas. El crecimiento celular se valoró espectrofotométricamente siguiendo la absorbancia del cultivo a una densidad óptica de 660 nm (UDO660). Se utilizó un matraz de vidrio de 250 ml, 24°C de temperatura y agitación orbital constante. La fase estacionaria se alcanzó a las 35 horas de crecimiento, a 5 UDO660. Cada 3-4 horas se tomó 1 ml del cultivo y se retiraron las células por centrifugación; 2-3 minutos en microcentrífuga (16000 xg).

### 15 Ejemplo 2

*Uso de la enzima para la producción de glucosa a partir de maltosa con sobrenadante de medio rico*

El sobrenadante del cultivo del Ejemplo 1 se utilizó para la liberación de glucosa a partir de maltosa por acción de la actividad glucosidasa del sobrenadante donde se encuentra la enzima extracelular. Para ello, 0.5 ml de la fracción libre de células y 0.5 ml de maltosa al 1% en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 5.5 se mezclaron e incubaron a 42°C durante 60 minutos. Se obtuvieron niveles apreciables de actividad glucosidasa desde el final de la fase de crecimiento logarítmico del cultivo hasta el inicio de la fase estacionaria, durante unas 20 horas de cultivo. Los máximos niveles de actividad (20 U/ml) se obtuvieron a 3-4 UDO660.

### 25 Ejemplo 3

*Producción de  $\alpha$ -glucosidasa a lo largo de un cultivo de X. dendrorhous crecido en medio mínimo con almidón*

30 Para la producción de  $\alpha$ -glucosidasa se cultivó *X. dendrorhous* MYA-131 crecido en 100 ml de Medio Mínimo Almidón (MMA): YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), almidón, DIFCO al 2% p/v) y se siguió durante 150 horas. El crecimiento celular se realizó y valoró como en el ejemplo anterior. La fase estacionaria se alcanzó a las 75 horas de crecimiento, a 3.4 UDO660. Cada 5-7 horas se obtuvo la fracción libre de células como en el Ejemplo 1.

### 35 Ejemplo 4

*Uso de la enzima para la producción de glucosa a partir de maltosa con sobrenadante de medio mínimo con almidón*

40 El sobrenadante del cultivo del Ejemplo 3 se utilizó para la liberación de glucosa a partir de maltosa por acción de la actividad glucosidasa del sobrenadante donde se encuentra la enzima extracelular. Para ello, 0.5 ml de la fracción libre de células y 0.5 ml de maltosa al 1% en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 5.5 se mezclaron e incubaron a 42°C durante 60 minutos. Se obtuvieron niveles valorables de actividad glucosidasa desde la mitad de la fase de crecimiento logarítmico del cultivo hasta el inicio de la fase estacionaria, durante unas 30 horas de cultivo. Los máximos niveles de actividad (15 U/ml) se obtuvieron a 2.3-2.5 UDO660.

### Ejemplo 5

50 *Degradación de almidón a partir de la enzima extracelular de un cultivo de X. dendrorhous crecido en medio mínimo con almidón*

El almidón presente en el medio a lo largo de la curva de crecimiento del cultivo del Ejemplo 3 se cuantificó con lugol (I<sub>2</sub> 0.15% (p/v), KI 0.5% (p/v)). Para ello, 0.05 ml de la fracción libre de células se mezclaron con 0.05 ml de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 5.5. A 0.025 ml de esta mezcla se le añadieron 0.1 ml de lugol y 2.5 ml de agua. El polisacárido se cuantificó espectrofotométricamente a 595 nm utilizando una curva patrón de almidón (1-10 mg/ml). El valor de almidón del 100% fue el valorado en el medio de cultivo inicial, el que se utilizó para realizar el inóculo. Utilizando esta metodología, no se apreció disminución de almidón en el medio extracelular durante las primeras 30 horas de cultivo. Se obtuvieron reducciones en la concentración del polisacárido del 10, 20, 40 y 60% a las 50, 60, 70 y 80 h de cultivo, respectivamente. El último valor, 60%, permaneció constante durante crecimientos prolongados, de hasta 300 horas.

### Ejemplo 6

65 *Degradación de almidón catalizada por la  $\alpha$ -glucosidasa de X. dendrorhous*

Se preparó una disolución al 10% (p/v) de almidón soluble (Paselli SA2, con un grado de polimerización medio de 50 unidades de glucosa) en tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.4. Sobre 10 ml de esta disolución se añadieron 0.5 ml de disolución de  $\alpha$ -glucosidasa pura correspondiente a la fracción 3 de la Tabla 2. La mezcla de reacción se incubó

## ES 2 255 847 A1

durante 168 horas a 40°C, en un agitador orbital a 200 rpm. El perfil de productos obtenidos en la hidrólisis de almidón se estudió por cromatografía líquida. El análisis de los productos formados se realizó mediante HPLC utilizando una bomba Waters 515, 2 columnas Aminex HPX-42A (BioRad) con dimensiones 300 x 4.6 mm, agua como fase móvil a 0.6 ml/min, 65°C, detector de índice de refracción Waters.

5

### Ejemplo 7

#### *Formación de oligosacáridos a partir de maltosa catalizada por la $\alpha$ -glucosidasa de X. dendrorhous*

10 Se preparó una disolución de alta concentración de maltosa (240 g/l) en tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.4. Se añadieron 0.7  $\mu$ g de  $\alpha$ -glucosidasa procedente de la disolución de  $\alpha$ -glucosidasa pura correspondiente a la fracción 3 de la Tabla 2. La mezcla de reacción se incubó durante 288 horas a 40°C, con agitación orbital a 200 rpm. A diferentes tiempos se extrajeron alícuotas, se incubaron 5 minutos a 80°C para inactivar la enzima, se diluyeron 1:4 (v/v) con agua, se centrifugaron 5 min a 6000 rpm en un tubo eppendorf con un filtro de 0.45  $\mu$ m y se analizaron por cromatografía líquida HPLC. El perfil de los productos formados se aprecia en la Fig. 7. Se puede apreciar que la  $\alpha$ -glucosidasa de *X. dendrorhous* presenta actividad de transferencia. Además, se forman dos familias de productos: oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4 (maltooligosacáridos), oligosacáridos que contienen algún enlace  $\alpha$ -1,6 (isomaltosa, panosa, etc.). A tiempo final (288 horas) la composición del sistema fue: 66.3 g/l de glucosa, 69.2 g/l de maltosa, 14.4 g/l de isomaltosa, 35.9 g/l de maltotriosa, 21.2 g/l de panosa, 15.4 g/l de maltotetraosa, y 17.6 g/l del tetrasacárido  $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de un producto enzimático con actividad  $\alpha$ -glucosidasa, que comprende cultivar células de *Xanthophyllomyces dendrorhous* en un medio y condiciones apropiados.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende el paso de recuperar el producto enzimático del medio de cultivo y/o de las células.
- 10 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde las células de *Xanthophyllomyces dendrorhous* pertenecen a una cepa seleccionada del grupo que consiste en ATCC:MYA-131, ATCC 24230, CECT 11028 y CECT 1690.
- 15 4. Producto enzimático con actividad  $\alpha$ -glucosidasa obtenible por el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Producto enzimático según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la actividad  $\alpha$ -glucosidasa tiene baja especificidad de sustrato, actuando sobre maltosa, maltotriosa, maltoheptosa, dextrinas, X- $\alpha$ -glucósido, glucógeno y almidón soluble.
- 20 6. Producto enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado** porque no tiene actividad  $\alpha$ -glucosidasa sobre isomaltosa, isomaltotriosa, pululan y dextrano.
7. Producto enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la actividad  $\alpha$ -glucosidasa presenta un máximo en el intervalo de pH entre 4.5 y 6.0 a 42°C, y en un intervalo de temperatura de 40 a 50°C.
- 25 8. Producto enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, **caracterizado** porque tiene actividad glicosiltransferasa en presencia de uno o varios sustratos glucídicos.
- 30 9. Producto enzimático según la reivindicación 8, **caracterizado** porque los sustratos glucídicos son maltooligosacáridos.
10. Producto enzimático según la reivindicación 9, donde los productos resultantes de la actividad glicosiltransferasa son oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4, oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,6 y/o oligosacáridos mixtos con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6.
- 35 11. Producto enzimático según la reivindicación 10, donde los productos resultantes de la actividad glicosiltransferasa son la maltotriosa, la maltotetraosa, la isomaltosa, la panosa y/o el tetrasacárido  $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu).
- 40 12. Procedimiento de obtención de oligosacáridos que comprende permitir que el producto enzimático definido en cualquiera de las reivindicaciones 4-11 actúe sobre uno o varios sustratos glucídicos.
13. Procedimiento de obtención de un producto enzimático con actividad  $\alpha$ -glucosidasa, según cualquiera de las reivindicaciones 2-3 que además comprende un paso (c) de purificar el producto enzimático hasta obtener una enzima sustancialmente pura.
- 45 14. Enzima sustancialmente pura con actividad  $\alpha$ -glucosidasa obtenible por el procedimiento definido en la reivindicación 13.
- 50 15. Enzima según la reivindicación 14, **caracterizada** porque la actividad  $\alpha$ -glucosidasa tiene baja especificidad de sustrato, actuando sobre maltosa, maltotriosa, maltoheptosa, dextrinas, X- $\alpha$ -glucósido, glucógeno y almidón soluble.
16. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, **caracterizada** porque no tiene actividad  $\alpha$ -glucosidasa sobre isomaltosa, isomaltotriosa, pululan y dextrano.
- 55 17. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, donde la actividad  $\alpha$ -glucosidasa presenta un máximo en el intervalo de pH entre 4.5 y 6.0 a 42°C, y en un intervalo de temperatura entre 40 y 50°C.
- 60 18. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, **caracterizada** porque tiene actividad glicosiltransferasa en presencia de uno o varios sustratos glucídicos.
19. Enzima según la reivindicación 18, **caracterizada** porque los sustratos glucídicos son maltooligosacáridos.
- 65 20. Enzima según la reivindicación 19, donde los productos resultantes de la actividad glicosiltransferasa son oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,4, oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -1,6 y/o oligosacáridos mixtos con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6.

## ES 2 255 847 A1

21. Enzima según la reivindicación 20, donde los productos resultantes de la actividad glicosiltransferasa son la maltotriosa, la maltotetraosa, la isomaltosa, la panosa y/o el tetrasacárido  $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  6)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu-(1  $\rightarrow$  4)- $\alpha$ -D-Glu).

5 22. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 14-21, **caracterizada** por tener un peso molecular calculado por filtración molecular de aproximadamente 115 kDa, y un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.5.

23. Procedimiento de obtención de oligosacáridos que comprende permitir que la enzima definida en cualquiera de las reivindicaciones 14-22 actúe sobre uno o varios sustratos glucídicos.

10

15

20

25

30

35

40

45

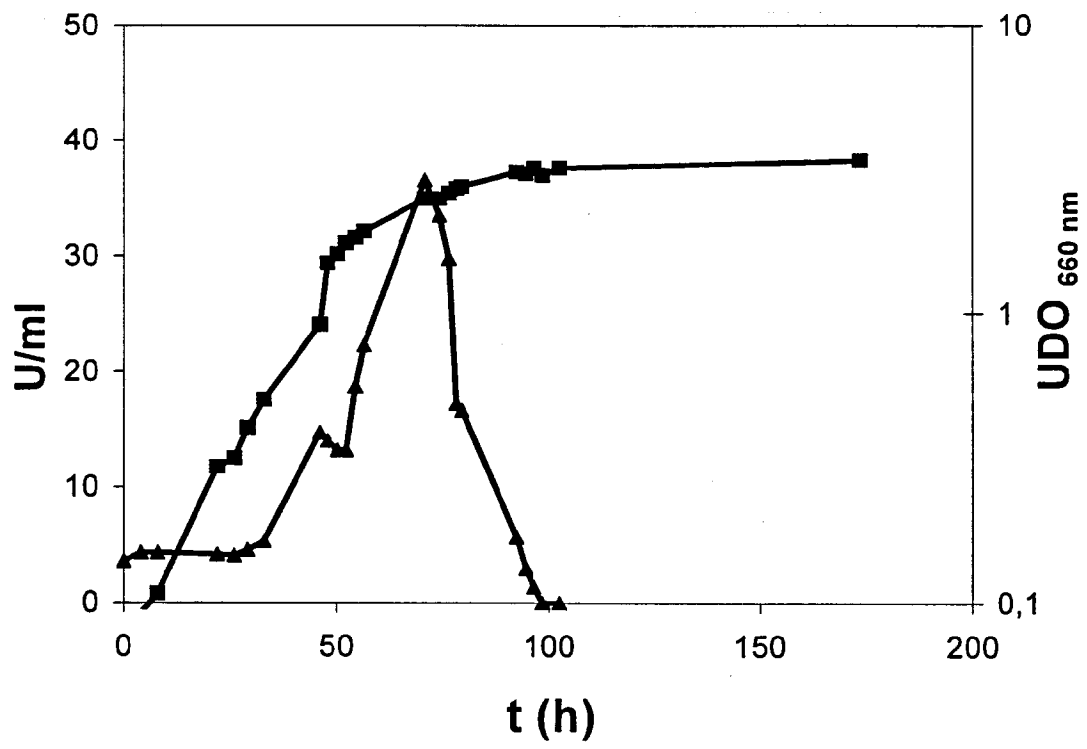
50

55

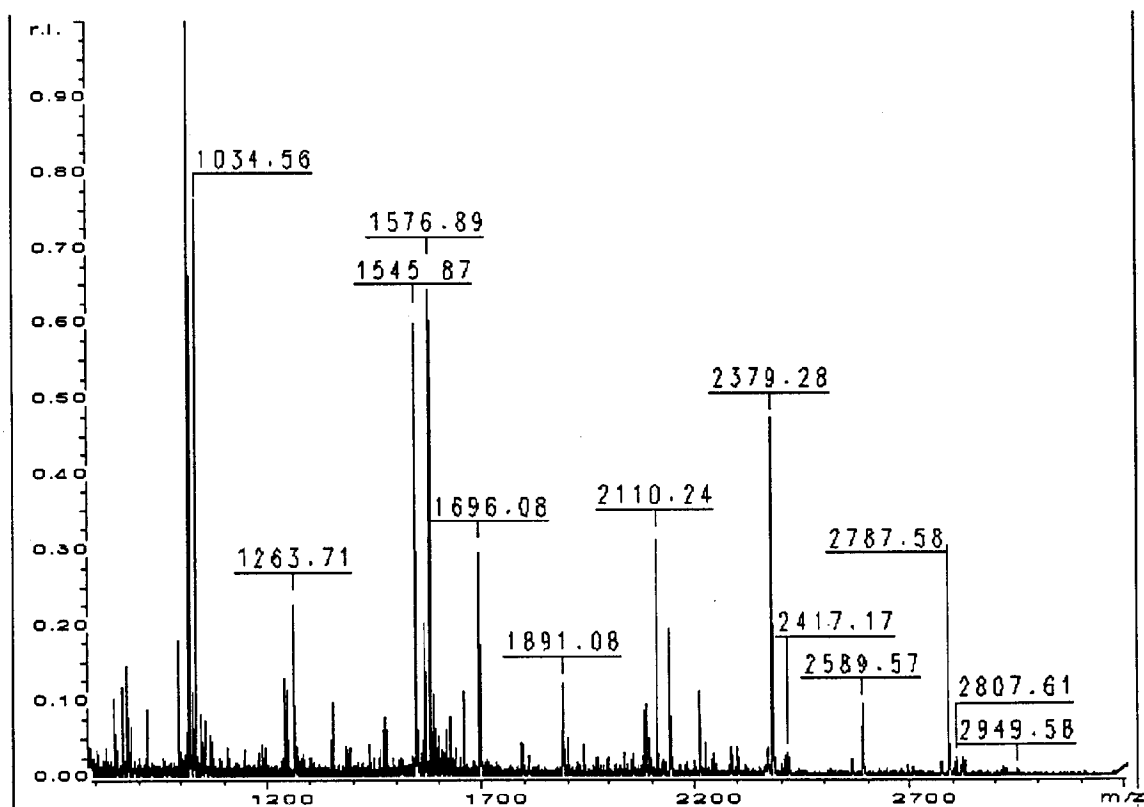
60

65

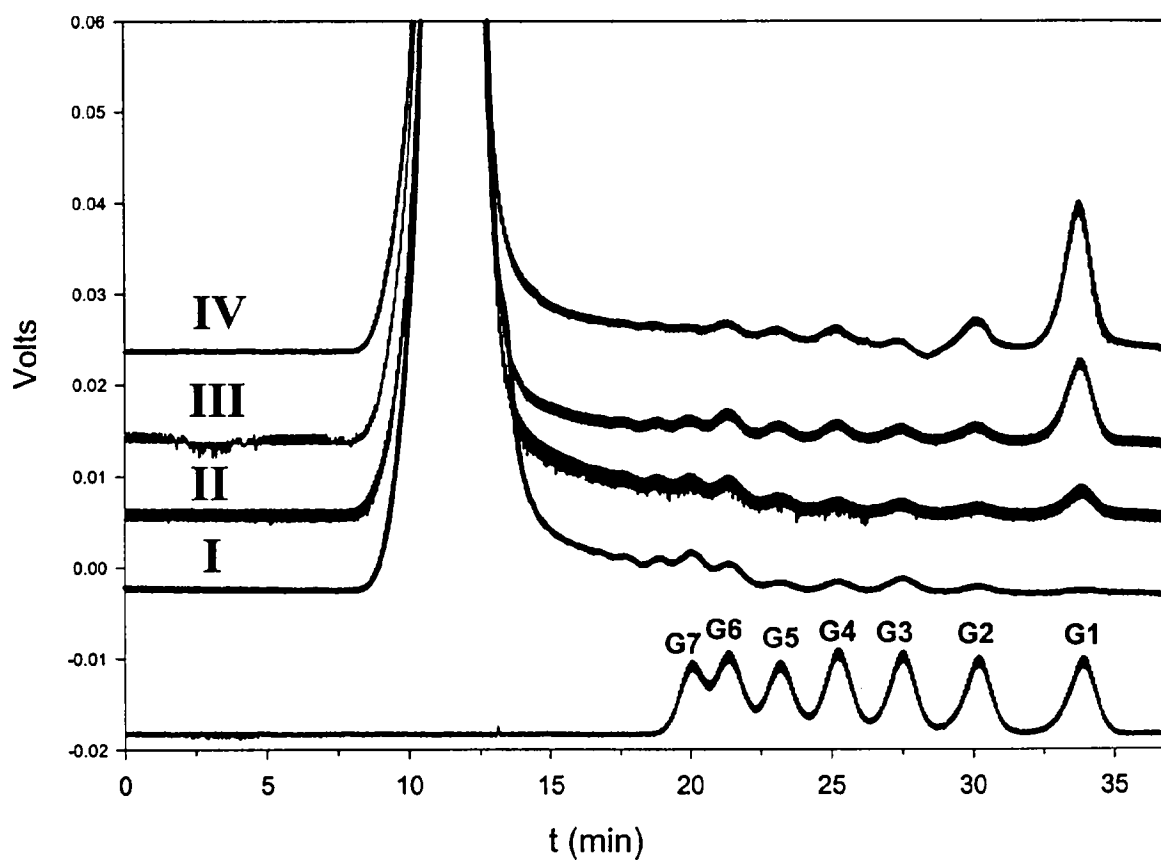
**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**



# FIG. 4

FIG. 4A

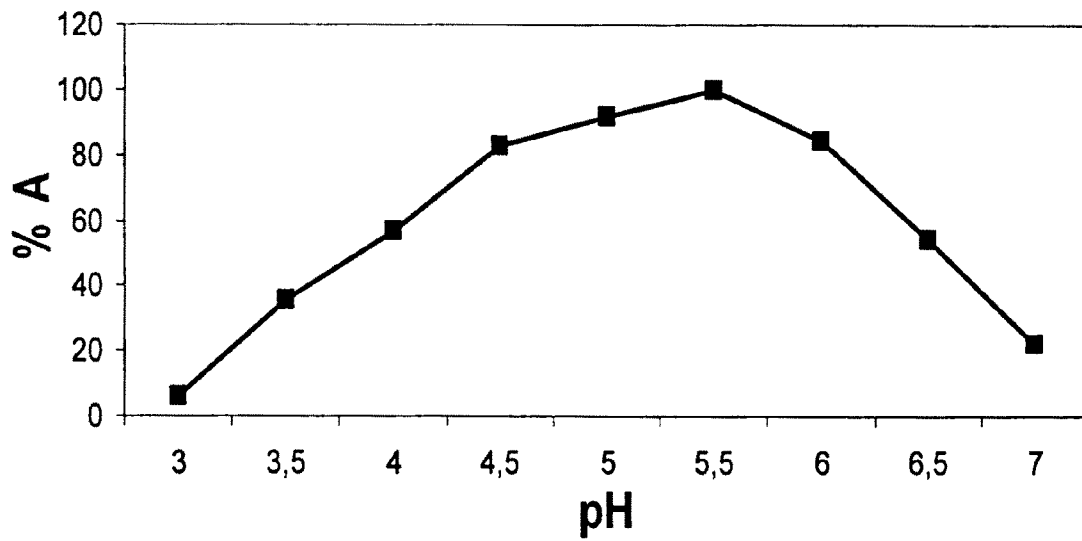
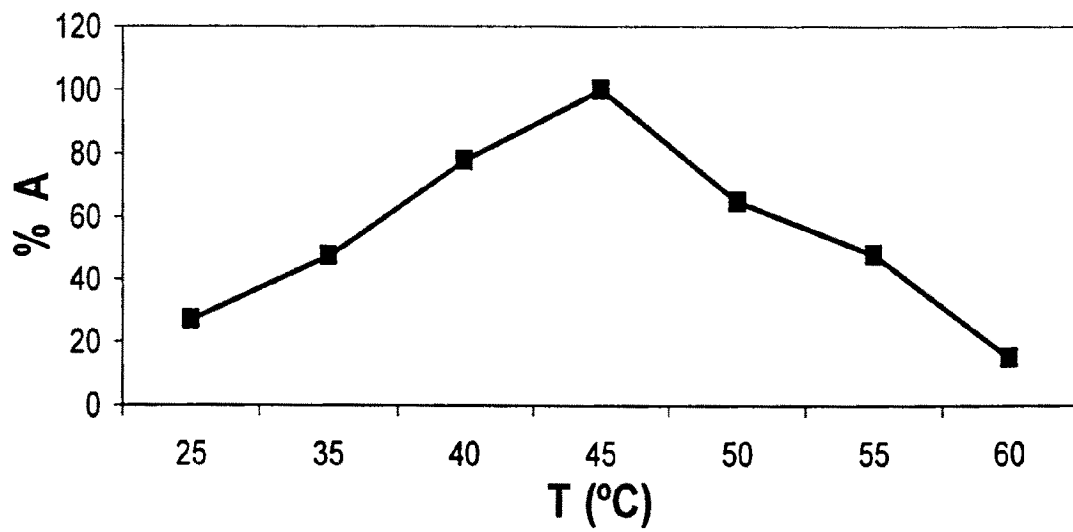
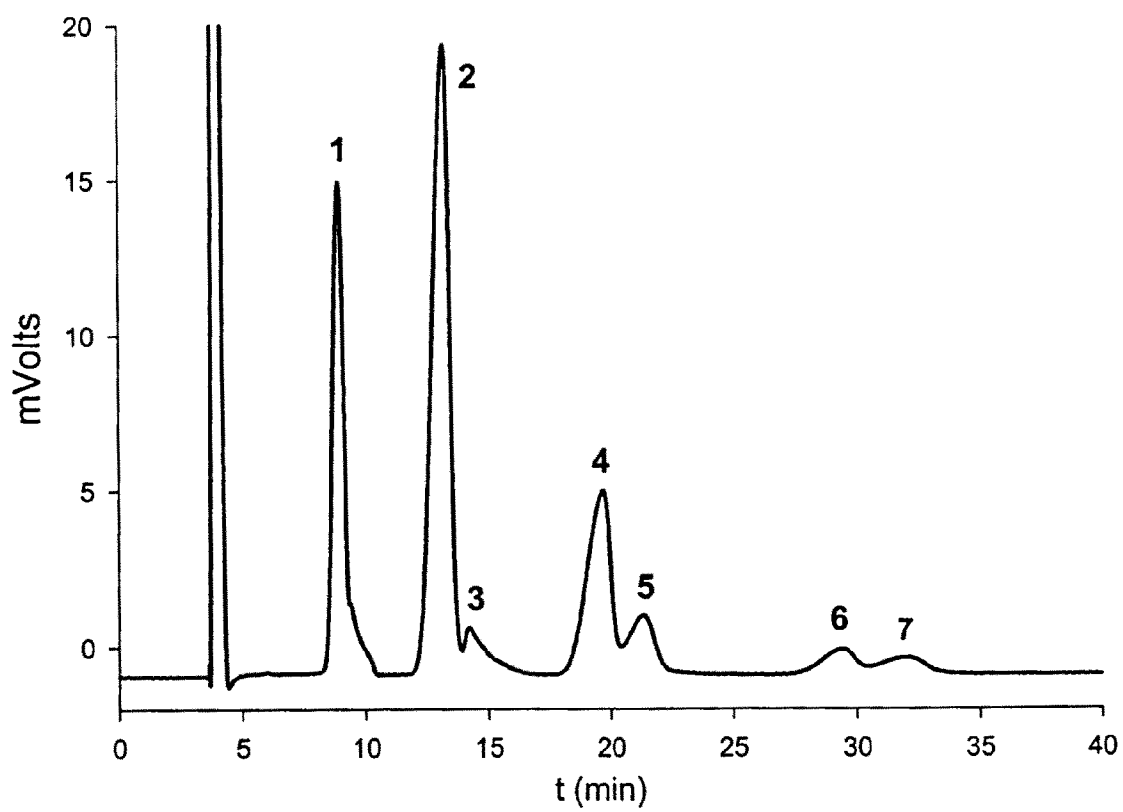


FIG. 4B



**FIG. 5**





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 255 847

② Nº de solicitud: 200402994

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2004

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KRITZINGER, S.M. et al.: "The Effect of Production Parameters on the Synthesis of the Prebiotic Trisaccharide, Neokestose, by Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma)" <i>Enz. Microb. Technol.</i> , Vol. 32, pp.: 728-737, (2003), todo el documento.	1-23
A	CRITTENDEN, R.G. et al.: "Production, Properties and Applications of Food-Grade Oligosaccharides", <i>Trends Food Sci &amp; Technol.</i> , Vol. 7, pp.: 353-361, (1996), todo el documento.	1-23
A	WON YUN, J. "Fructooligosaccharides-Ocurrence, Preparation, and Application", <i>Enz. Microb. Technol.</i> , Vol. 19, pp.: 107-117, (1996), todo el documento.	1-23
A	HEUNG LEE, J. et al.: Reaction Route for Enzymatic Production of Neofructo-oligosaccharides from Sucrose Using <i>Penicillium citrinum</i> Cells", <i>J. Microbiol.</i> , Vol. 39, nº 4, pp.: 331-333, (2001), todo el documento.	1-23

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.03.2006

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 9/26** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C07H 3/06** (2006.01)