



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 328 659**

② Número de solicitud: 200801401

⑤ Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.05.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.11.2009**

⑦ Solicitante/s:

Universidad Autónoma de Madrid (Titular al 80%)

Ciudad Universitaria Cantoblanco

c/ Einstein, 3

28049 Madrid, ES

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

(Titular al 20%)

⑧ Inventor/es: **Fernández Lobato, María;**

Gutiérrez Alonso, Patricia;

Fernández Arrojo, Lucía y

Plou Gasca, Francisco José

⑨ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

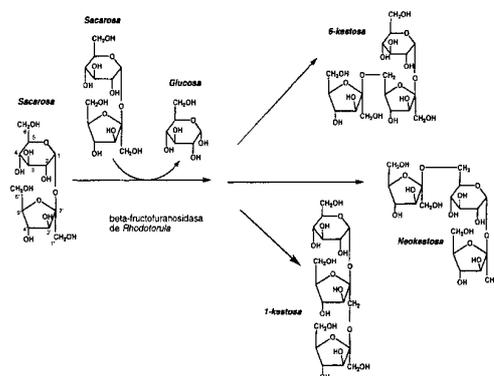
④ Título: **Nueva actividad fructofuranosidasa de *Rhodotorula* para la obtención de oligosacáridos prebióticos.**

⑤ Resumen:

Nueva actividad fructofuranosidasa de *Rhodotorula* para la obtención de oligosacáridos prebióticos.

Se proporciona un procedimiento viable industrialmente de obtención de oligosacáridos prebióticos para ser utilizados como ingredientes funcionales en productos dietéticos, productos lácteos, alimentos infantiles y alimentos para animales, que utiliza una nueva enzima fructofuranosidasa de *Rhodotorula*. También se proporciona un procedimiento de obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, así como de la enzima sustancialmente pura con esta actividad.

FIG. 6



ES 2 328 659 A1

DESCRIPCIÓN

Nueva actividad fructofuranosidasa de *Rhodotorula* para la obtención de oligosacáridos prebióticos.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la industria biotecnológica y, en particular, en 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. Las moléculas prebióticas líderes en el mercado europeo son los fructooligosacáridos (FOS) (P. T. Sangeetha, M.N. Armes, S. G. Prapulla, "Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides, Trends Food Sci. Technol. 2005, vol. 16, pp. 442-457). Existen 3 tipos de fructooligosacáridos descritos hasta la fecha. Los más conocidos (serie ¹F) son los que se comercializan actualmente, y están formados por moléculas de fructosa unidas por enlaces β ,2-1, con una molécula de glucosa en un extremo (J.W. Yun, "Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application" Enzyme Microb. Technol. 1996, vol. 19, pp. 107-117), abreviándose como GF_n, estando *n* típicamente comprendido entre 2 y 4 (kestosa, nistosa y fructosilnistosa). En los fructooligosacáridos del segundo tipo (serie ⁶F), las moléculas de fructosa se encuentran unidas por enlaces β ,2-6, con una molécula de glucosa en el extremo no reductor. Normalmente estos FOS están presentes en la naturaleza en forma de polímeros de alto peso molecular (levanos). La neokestosa, trisacárido en el que una fructosa se encuentra unida por un enlace β ,2-6 a la unidad de glucosa en la sacarosa, es el primer representante de la serie ⁶G (tercer tipo de FOS). Los tres tipos de FOS, resisten la digestión en la parte superior del tracto intestinal, y se metabolizan por las bacterias endógenas del colon. Se ha demostrado que poseen la capacidad de estimular el crecimiento de las bifidobacterias (A. V. Rao, "Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenic effects" J. Nutr. 1998, vol. 80, pp.1442S-1445S). Los efectos de los FOS 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 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.

40 Los FOS pueden obtenerse por hidrólisis parcial de polisacáridos naturales (inulina, levano, etc.) o por síntesis enzimática a partir de sacarosa. El perfil de productos (esp. en cuanto al grado de polimerización medio) que se genera por ambas metodologías es notablemente distinto, lo que repercute en sus propiedades.

Se ha descrito la producción de fructooligosacáridos de la serie ¹F por vía hidrolítica a partir de inulina o por vía sintética mediante el empleo de sacarosa 1-fructosiltransferasas (EC 2.4.1.9.), beta-fructofuranosidasas -invertasas (EC 3.2.1.26) e incluso por levansacarasas (EC 2.4.1.10) (L.E. Trujillo et al., "Fructo-oligosaccharides production by *thr* Gluconacetobacter diazotrophicus levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*"; Enzyme Microb. Technol. 2001, vol. 28, pp. 139-144). Empleando algunas beta-fructofuranosidasas el rendimiento de síntesis que se alcanza no representa más del 4% del total de carbohidratos de la mezcla, mientras que con 1-fructosiltransferasas el rendimiento que se puede llegar a alcanzar es mucho mayor (en torno al 50-60% referido al peso total de azúcares) (M. Antosova, M. Polakovic, "Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides" Chem. Pap. 2001, vol. 55, pp. 350-358). En la actualidad, los FOS de la serie ¹F se producen industrialmente utilizando, una beta-fructofuranosidasa de *Aspergillus niger* para generar oligosacáridos de cadena corta, de 3-5 unidades (C. Vannieuwenburgh et al., "Kinetic studies and mathematical model for sucrose conversion by *Aspergillus niger* fructosyl-transferase under high hydrostatic pressure", Bioprocess Biosyst Eng. 2002, vol. 25, pp. 13-20). Otras enzimas con actividad fructosiltransferasa han sido descritas en hongos como *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus japonicus* (C. S. Chien et al., "Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides". Enzyme Microb. Technol. 2001, vol. 29, pp. 252-257).

60 Los fructooligosacáridos de bajo peso molecular de la serie ⁶F se obtienen mediante hidrólisis ácida a partir del polímero levano. Por vía sintética, tan solo se ha descrito la formación de FOS de la serie ⁶F con la beta-fructofuranosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* (también *Debaryomyces occidentalis*) (M Fernández Lobato y col., "Nueva actividad fructofuranosidasa para la obtención del oligosacárido prebiótico 6-kestosa", Patente ES-P200503195, UAM-CSIC), con la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (S. Farine, et al., Application of high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalysed hydrolysis of sucrose and formation of intermediate fructan products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001, vol. 55, pp. 55-60), y como producto minoritario en la formación de 1-kestosa a partir de la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* (M. Bekers et al., o "Fructooligosaccharide and levan pro-

ducing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase”, *Process Biochem.* 2002, vol. 38, 701-706). En los trabajos referidos hasta ahora en la bibliografía, para la producción de fructooligosacáridos de la serie ⁶G, se emplean células completas de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (también llamada *Phaffia rhodozyma*) o de diversos hongos (p. ej. *Penicillium citrinum*, células inmovilizadas) (Lee et al., “Reaction route for enzymatic production of neofructo-oligosaccharides from sucrose using *Penicillium citrinum* cells”, *J. Microbiol.* 2001, vol. 39, pp. 331-333; Park et al., “Continuous production of neo-fructooligosaccharides by immobilization of whole cells of *Penicillium citrinum*”, *Biotechnol. Lett.* 2005, vol. 27, pp. 127-130). Se ha patentado una fructofuranosidasa extracelular de *X. dendrorhous* con actividad transfructosilasa capaz de formar fructooligosacáridos de la serie ⁶G (en particular neokestosa) y ¹F (en particular 1-kestosa) (P200501875, UAM-CSIC Cobertura PCT (PCT-ES22006/000435), Licenciada a Genoma España).

Las *Rhodotorulas* son levaduras basidiomycetes de color rosado de amplia distribución en la naturaleza. Estas levaduras se caracterizan por producir grandes cantidades de lípidos de distinto tipo (USP20020142408; USP20040072311; USP20060035351) y han sido utilizadas para la producción de ácido ascórbico (USP20050260722) y enzimas de interés industrial como la D-aminoácido oxidasa (ES19960422; USP 5877013). En *Rhodotorula glutinis* se ha descrito una invertasa homodimérica que solamente es secretada cuando el medio esta suplementado con sacarosa o rafinosa y cuya producción está regulada por la presencia de glucosa (M. C. Rubio et al., “Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*”, *Phytochemistry* 2002, vol. 61, pp. 605-609). El gen que dirige la síntesis de esta enzima no está caracterizado, y no hay datos disponibles referentes a su actividad sobre distintos sustratos o sobre su capacidad fructosiltransferasa.

Dada la importancia industrial de los oligosacáridos prebióticos, es deseable proporcionar enzimas y procedimientos para su obtención que sean viables industrialmente.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a la caracterización de una nueva actividad fructosiltransferasa asociada a la actividad invertasa extracelular de levaduras pertenecientes al género *Rhodotorula*, sumamente útil para la obtención de oligosacáridos prebióticos, principalmente 6-kestosa, neokestosa y 1-kestosa. Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un producto enzimático con actividad fructosiltransferasa, que comprende cultivar células de *Rhodotorula* 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 *Rhodotorula*. Ejemplos de cultivo se describen en detalle más adelante.

La actividad fructosiltransferasa se asocia a la de β -D-fructofuranosidasa o invertasa (EC 3.2.1.26) (IUBMB Enzyme Nomenclature, CAS Registry Number 9001-42-7), enzimas que hidrolizan la sacarosa en fructosa y glucosa.

El producto enzimático crudo, resultado del anterior procedimiento de la invención, ya puede ser utilizado industrialmente para la obtención de oligosacáridos sin requerir etapas de separación o purificación posteriores. 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 *Rhodotorula* con el medio de cultivo apropiado para que se haya expresado la actividad fructofuranosidasa, 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 *Rhodotorula* pertenecen a una cepa seleccionada del grupo que consiste en *R. mucilaginoso* (CECT 10044, CECT 10059, CECT 10087, CECT 10291 y CECT 10359), *R. gracilis* ATCC 1416 y *R. rubra* ATCC 90687. Los valores de mayor actividad invertasa se obtuvieron utilizando las cepas de *Rhodotorula* CECT 10359 y ATCC 1416.

Un segundo aspecto de la invención, se refiere al producto enzimático con actividad fructosiltransferasa obtenible por el procedimiento definido anteriormente. El producto enzimático de la invención es muy eficiente en la degradación de sacarosa y actúa también sobre oligosacáridos como 1-kestosa, nistosa. En una realización particular de la invención, el producto enzimático de la invención se caracteriza porque la actividad beta-fructofuranosidasa tiene baja especificidad de sustrato, actuando sobre sacarosa, 1-kestosa, nistosa, palatinosa, turanosa y leucrosa. En otra realización particular, la actividad beta-fructofuranosidasa del producto enzimático presenta un máximo en el intervalo de pH entre 4.5 y 5.5 a 42°C, y en un intervalo de temperatura entre 40 y 60°C.

Además de la actividad fructofuranosidasa, el producto enzimático de la invención tiene actividad fructosiltransferasa en presencia de altas concentraciones de sacarosa. En una realización particular, los productos resultantes de la actividad fructosiltransferasa son fructooligosacáridos de la serie ⁶F (en particular 6-kestosa), ⁶G (en particular neokestosa) y en menor medida de la serie ¹F (en particular 1-kestosa).

Así pues, un tercer aspecto de la presentación invención se refiere a un procedimiento de obtención de una enzima sustancialmente pura con actividad fructofuranosidasa/fructosiltransferasa, que comprende los pasos de: (a) obtener un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa/fructosiltransferasa mediante el cultivo de células de *Rho-*

ES 2 328 659 A1

dotorula 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 fructofuranosidasa/fructosiltransferasa.

5 Por tanto, otro aspecto de la presente invención, también se refiere a una enzima sustancialmente pura con actividad Fructofuranosidasa/fructosiltransferasa 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.

10 Las características indicadas de especificidad de sustrato para el producto enzimático de la invención se atribuyen también a la enzima purificada. La actividad fructosiltransferasa también es característica de la enzima purificada.

15 Algunos aspectos positivos del producto enzimático y de la enzima de la invención, son que presentan un variado 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 la enzima es estable durante largos tiempos de reacción (p.ej. 600 h) a una temperatura de aproximadamente 40°C en presencia de altas concentraciones de sacarosa.

20 La presente invención conlleva un procedimiento de obtención de fructooligosacáridos, principalmente 6-kestosa, neokestosa y 1-kestosa, viable industrialmente. Además, la composición del producto de reacción (en particular, su contenido en trisacáridos y tetrasacáridos) puede ser controlado en función del tiempo de reacción. 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
25 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 *Rhodotorula*, 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.

30

Caracterización enzimática

A) Expresión de la actividad fructofuranosidasa de *Rhodotorula*

35

La producción de actividad fructofuranosidasa se analizó en cultivos de *Rhodotorula* crecidos en medio mínimo para levaduras suplementado con maltosa. Los cultivos se realizaron en matraces de vidrio incubados a una temperatura comprendida entre 28-30°C y con agitación orbital constante de 180-235 rpm. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron 30°C y 235 rpm. Se obtuvo la fracción libre de células por centrifugación (F-0) de un cultivo de
40 *Rhodotorula* crecido a 30°C y 235 rpm. En ella se ensayó la actividad fructofuranosidasa 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: O-Dianisidina 0.6%). Se incubó 30 minutos a 37°C y cuantificó espectrofotométricamente a 450 nm. Se utilizó
45 una curva patrón de glucosa (1 a 100 µg/ml). La unidad de actividad fructofuranosidasa se define en µmol/min de glucosa valorada en las condiciones descritas. La Fig. 1 muestra los resultados obtenidos cuando se utiliza la cepa ATCC1416 y el ensayo se realiza sobre sacarosa.

50 B) Caracterización de la actividad fructofuranosidasa de *Rhodotorula* después del cultivo y centrifugación de la fracción libre de células

La fracción libre de células, obtenida por centrifugación, de un cultivo de *Rhodotorula* crecido en medio mínimo maltosa: YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), maltosa como fuente de carbono al 2%
55 (p/v), crecido hasta una densidad óptica de 3.3 UDO660 nm, se concentró utilizando un sistema de filtración tangencial (filtro de 30 kDa) seguida de diálisis frente a HCl-Tris 20 mM pH 7 durante 2 horas a una temperatura de 4°C y se ensayó sobre distintos sustratos. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 1. No se detectó actividad cuando se utilizó como sustrato lactosa, maltosa o maltotriosa.

60

65

ES 2 328 659 A1

TABLA 1

Actividad fructofuranosidasa de la fracción extracelular de *R. gracilis* ATCC1416 sobre diferentes carbohidratos

Sustrato	Actividad específica (mU/μg)
Sacarosa	35
1-Kestosa	35
Nistosa	32
Palatinosa	25
Turanosa	7.5
Leucrosa	5

C) Purificación de la enzima con actividad fructofuranosidasa de *Rhodotorula*

Para la purificación de la enzima se partió de 1 litro de fracción extracelular de *R. gracilis* ATCC1416, con una actividad fructofuranosidasa de 0.63 U/ml. Se utilizó el siguiente método:

1º) Concentración de la fracción extracelular utilizando un sistema de filtración tangencial (filtro de 30 kDa) seguida de diálisis frente a HCl-Tris 20 mM pH 7 (tampón A) durante 2 horas a una temperatura de 4°C. Se obtuvieron 45 ml de concentrado con una actividad de 14 U/ml (F-1).

2º) Cromatografía de intercambio iónico a pH 7. Se aplicaron 30 ml de la muestra a una columna de 250 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 2 M. La fracción eluida a 0.1 M de sal presentaba una actividad de 8.43 U/ml (F-2).

La purificación fue seguida analizando las proteínas presentes tras cada uno de los pasos de la purificación en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Los resultados obtenidos con la fracción F-2 se muestran en la Fig. 2. La proteína purificada tiene 172 kDa.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 328 659 A1

D) Caracterización de la actividad beta-fructofuranosidasa de la enzima purificada

La actividad hidrolítica de la enzima purificada (F-2), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se ensayó sobre distintos sustratos. El máximo nivel de actividad se obtiene sobre sacarosa. No se observó actividad sobre lactosa, maltosa o maltotriosa. Los resultados obtenidos se recopilan en la Tabla 2.

TABLA 2

Actividad fructofuranosidasa de la fracción F-2 de *R. gracilis* ATCC 1416 sobre distintos sustratos. Los ensayos se realizaron utilizando proteína purificada, 1 h de incubación y una concentración para todos los sustratos ensayados del 1% (p/v)

Sustrato	Actividad específica (mU/μg)
Sacarosa	267
1-Kestosa	200
Nistosa	53.4
Turanosa	60,7
Palatinosa	28.7
Leucrosa	17.4

La actividad fructofuranosidasa se ensayó a diferentes pH y temperaturas. Se obtuvieron niveles máximos de actividad en un rango de pH comprendido entre 4.5 y 5.5 unidades y una temperatura de 40 y 60°C. La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos.

E) Caracterización por espectrometría de masas de la enzima con actividad fructofuranosidasa de *Rhodotorula*

La proteína se digirió con tripsina (Tripsina-TPCK Promega) en condiciones de digestión estándar (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-assisted 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 α -ciano-4-hidroxicinámico) como matriz en condiciones de saturación y ácido trifluoroacético 0,1% y acetonitrilo 33% (v/v). El resultado obtenido se muestra en la Fig. 4. 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 tripticos 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 ADN.

F) Actividad fructosiltransferasa de la fracción F-1 de *Rhodotorula*

Se ensayó la actividad de transglucosilación del concentrado enzimático obtenido por ultrafiltración (F-1). Se preparó una reacción utilizando una alta concentración de sacarosa (600 g/l), para favorecer la formación de enlaces glicosídicos en detrimento de la reacción de hidrólisis, y una actividad enzimática final en la mezcla de reacción de aproximadamente 5 U/ml. Se observó que la enzima de *Rhodotorula* presentaba conjuntamente actividad de hidrólisis y actividad de transferencia. Se forman, por una parte, fructosa y glucosa como productos hidrolíticos. Por otra parte, se obtienen un trisacárido mayoritario, identificado como 6-kestosa [β -D-Fru-(2→6)- β -D-Fru-(2→1)- α -D-Glu]. La sacarosa que todavía no ha reaccionado está también presente en la reacción.

En la Tabla 3 se muestra la composición (en g/l) de los carbohidratos presentes en la mezcla de reacción a lo largo de 66 y 164 horas de incubación a 45°C para las cepas de *Rhodotorula* CECT 10359 y ATCC 1416, respectivamente. En el punto de máxima producción de FOS, 66 y 20 horas para CECT 10359 y ATCC1416, se obtuvo un porcentaje del 11.7% y 13% de FOS, respectivamente, respecto al total de carbohidratos en la mezcla.

ES 2 328 659 A1

TABLA 3

Composición de la mezcla de reacción con el tiempo tras la incubación a 45°C de sacarosa con el concentrado enzimático, F-1, de *Rhodotorula* CECT 10359 (A) y ATCC 1416 (B), respectivamente. Condiciones de reacción: 600 g sacarosa/l en 0.2 M acetato sódico (pH 5.6), 150 rpm. El ensayo se realizó con 5 U/ml de biocatalizador (una unidad corresponde a la formación de un micromol de azúcares reductores por minuto). 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 evaporativo de dispersión de luz (light-scattering). Nombre de los compuestos: 1, fructosa; glucosa; 3, sacarosa [α -D-Glu-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru]; 4, 6-kestosa [β -D-Fru-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fru-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glu]

(A)

Tiempo de reacción (h)	Composición de la mezcla de reacción (gramos/litro)				Porcentaje (p/p) de FOS ^a
	1	2	3	4	
0	0	0	600	0	0
20	94.6	123.6	322.5	59.3	9.9
66	114	155.6	260.3	70.1	11.7
164	211.3	248.7	74.6	65.3	10.9

^a Porcentaje de fructo-oligosacáridos referido al peso total de azúcares.

(B)

Tiempo de reacción (h)	Composición de la mezcla de reacción (gramos/litro)				Porcentaje (p/p) de FOS ^a
	1	2	3	4	
0	0	0	600	0	0
20	94.6	123.6	322.5	59.3	13
66	272.4	287.4	16	24.2	4

^a Porcentaje de fructo-oligosacáridos referido al peso total de azúcares.

TABLA 4

Programa de gradiente utilizado para el análisis de las muestras por cromatografía líquida de alta resolución

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Acetonitrilo	% H ₂ O
0	0.9	75	25
3	0.9	75	25
4	0.9	70	30
6	0.9	70	30
8	0.9	60	40
20	0.9	60	40
22	0.9	75	25

ES 2 328 659 A1

G) Actividad fructosiltransferasa de la fracción F-2 de *Rhodotorula*

Se ensayó la actividad de transglicosilación de la enzima pura (fracción F-2) de la cepa ATCC1416. Se preparó una reacción utilizando una alta concentración de sacarosa (516 g/l) y una actividad enzimática final en la mezcla de reacción de aproximadamente 0.8 U/ml (una unidad corresponde a la formación de un micromol de azúcares reductores por minuto). La Fig. 5 muestra el cromatograma de la mezcla de reacción a las 264 horas. Se aprecia la formación de tres trisacáridos (6-kestosa, neokestosa y 1-kestosa), dos tetrasacáridos y un disacárido que probablemente, basándose en la especificidad de la enzima, sea blastosa [α -D-Glu-(1 \rightarrow 6)- β -D-Fru]. El esquema general de la reacción de transglicosilación se muestra en la Fig. 6. La nueva enzima caracterizada en este trabajo sigue manteniendo actividad fructosiltransferasa tras 672 horas a 40°C. La mayor producción de fructooligosacáridos se produjo a las 71 horas de reacción: 61.7 g/l de 6-kestosa, 10.3 g/l neokestosa, 3.2 g/l 1-kestosa y 12.7 g/l tetrasacáridos. La Fig. 7 muestra la evolución de la formación de fructooligosacáridos con el tiempo de reacción. El porcentaje total (p/p) de fructooligosacáridos a las 71 horas fue del 17.0%, valor referido al peso total de carbohidratos en el medio.

TABLA 5

Composición de la mezcla de reacción con el tiempo tras la incubación a 40°C de 516 g/l sacarosa con la enzima purificada, F-2, de *Rhodotorula* ATCC 1416. Condiciones de reacción: 516 g sacarosa/l en 0.2 M acetato sódico (pH 5.6), 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 evaporativo de dispersión de luz (light-scattering). Nombre de los compuestos: 1, fructosa; 2, glucosa; 3, sacarosa [α -D-Glu-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru]; 4, blastosa [α -D-Glu-(1 \rightarrow 6)- β -D-Fru]; 5, neokestosa [β -D-Fru-(2 \rightarrow 6)- α -D-Glu-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru]; 6, 1-kestosa [β -D-Fru-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fru-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glu]; 7, 6-kestosa [β -D-Fru-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fru-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glu]; 8+9, tetrasacáridos

Tiempo de reacción (h)	Composición de la mezcla de reacción (gramos/litro)								Porcentaje (p/p) de FOS
	1	2	3	4	5	6	7	8+9	
0	0,0	0,0	516,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18	59,5	91,8	303,3	0,0	8,4	2,5	50,6	0,0	11,9
24	76,8	108,8	250,3	5,8	10,2	4,2	59,9	0,0	14,4
42	103,1	138,7	181,6	10,6	10,6	2,6	68,9	0,0	15,9
71	122,4	165,1	127,4	13,3	10,3	3,2	61,7	12,7	17,0
209	156,3	197,7	70,6	15,8	9,5	2,8	50,5	12,8	14,6
240	162,3	211,0	56,7	13,4	8,5	2,8	48,3	13,0	14,1
264	163,0	207,8	56,5	15,8	9,9	2,8	49,8	10,5	14,1
354	177,0	217,5	39,2	16,1	8,8	2,7	42,4	12,2	12,8
377	175,1	223,8	39,5	16,1	8,3	2,4	42,8	8,1	11,9
570	190,6	231,2	24,8	14,5	8,9	2,3	32,0	11,7	10,6
596	190,3	226,7	28,0	15,3	6,6	2,4	33,6	13,2	10,8
672	189,4	230,4	24,9	16,1	7,2	2,7	32,0	13,4	10,7

^a Porcentaje de fructo-oligosacáridos referido al peso total de azúcares.

G) Efecto de la temperatura en la actividad fructosiltransferasa de la fracción F-2 de *Rhodotorula*

Se estudió el efecto de la temperatura en la reacción de transglicosilación utilizando una alta concentración de sacarosa (516 g/l). La Figura 8 (superior) muestra la producción global (en gramos/litro) de kestosas (6-kestosa, neokestosa y 1-kestosa) a tres temperaturas distintas (30, 40 y 50°C) y a tres tiempos distintos (18, 24 y 42 horas). Se concluye que la temperatura óptima para la reacción de transglicosilación es 40°C, ya que la producción de kestosas

es la mayor a todos los tiempos de reacción analizados. También se aprecia la posible inactivación del biocatalizador a 50°C durante largos periodos de tiempo. La Figura 8 (inferior) muestra la formación de fructosa a las tres temperaturas y tiempos de reacción anteriores. Es destacable el hecho de la menor velocidad de hidrólisis a medida que aumenta la temperatura, ya que disminuye la cantidad de fructosa libre en el sistema.

5

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.

10

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la producción de actividad fructofuranosidasa extracelular a lo largo del cultivo de *R. gracilis* ATCC1416. La levadura se creció en Medio maltosa 2% a 30°C y agitación orbital constante de 235 rpm durante 45 horas. Se representa el crecimiento del cultivo en UDO a 660 nm (rombos) y la actividad fructofuranosidasa valorada en el medio extracelular, en U/ml (cuadrados), alcanzada a los tiempos que se indican. La actividad se ensayó sobre sacarosa al 0.5% (p/v).

15

La figura 2 muestra el resultado del análisis por SDS-PAGE de las proteínas presentes en el proceso de purificación. Se concentraron 1.8 ml de la fracción F-2 hasta 40 µl (45 veces) utilizando Microconcentradores de Amicon-Millipore (YM-10), 10 µl del concentrado se analizaron en geles de poliacrilamida al 7.5% (F-2). El gel se tiñó con azul de Coomassie siguiendo la metodología estándar. M: Marcadores de peso molecular (el peso se indica a la izquierda en kDa).

20

La figura 3 indica la actividad enzimática en función del pH y de la temperatura, mostrando los máximos correspondientes. Los ensayos se realizaron sobre sacarosa utilizando una solución de proteína pura. El 100% se corresponde con una actividad de 34 U/ml. Fig. 3A: Se valoró la actividad fructofuranosidasa a distintos pHs (3-9 unidades pH), una temperatura de ensayo de 42°C y tampón citrato sódico, fosfato sódico y HCl-Tris (todos ellos 100 mM) para el intervalo de pH de 3-4.5, 4.5-7.5 y 7.5-9.0, respectivamente. Fig. 3B: El ensayo de temperaturas (20-80°C) se realizó en fosfato sódico 50 mM pH 5.5.

25

30

La figura 4 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 tripticos 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 α -ciano-4-hidroxicinámico) como matriz en condiciones de saturación.

35

La figura 5 muestra el perfil de productos obtenidos tras la incubación de sacarosa en una concentración de 516 g/l con el producto enzimático purificado (F-2) de las cepas de *Rhodotorula* ATCC 1416. 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 cromatográfico corresponde a las 264 h de reacción.

40

La figura 6 muestra un esquema de la reacción de transglucosilación catalizada por la beta-fructofuranosidasa de *Rhodotorula*.

45

La figura 7 muestra el perfil de la producción de oligosacáridos tras la incubación de sacarosa en una concentración de 516 g/l con la enzima pura (F-2) de *Rhodotorula* ATCC 1416. Las condiciones de reacción, las condiciones de análisis mediante HPLC y los nombres de los compuestos son los mismos que en la Tabla 5.

50

La figura 8 muestra el efecto de la temperatura de reacción en la producción de kestosas (A) y en la actividad hidrolítica (B) de la enzima (directamente proporcional a la cantidad de fructosa libre).

55

Ejemplos de realización

55

Ejemplo 1

Producción de beta-fructofuranosidasa a lo largo de cultivos de Rhodotorula mucilaginosa CECT 10087 crecido en medio mínimo

60

Para la producción de fructofuranosidasa, se cultivó *Rhodotorula* de la cepa CECT 10087 en 100 ml de medio mínimo para levaduras suplementado con maltosa: YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), y la fuente de carbono al 2% (p/v). El cultivo se siguió durante 40 horas. El crecimiento celular se valoró espectrofotométricamente siguiendo la absorbancia del cultivo a una densidad óptica de 660 nm (UDO₆₆₀). Se utilizaron matraces de vidrio de 250 ml, 29°C de temperatura y agitación orbital constante de 250 rpm. La fase estacionaria se alcanzó a 4.36 UDO₆₆₀.

65

ES 2 328 659 A1

Ejemplo 2

Uso de la enzima para la producción de glucosa a partir de sacarosa con sobrenadante de medio mínimo

- 5 Los sobrenadantes del cultivo del Ejemplo 1 se utilizaron para la liberación de glucosa a partir de sacarosa por acción de la actividad fructofuranosidasa del sobrenadante donde se encuentra la enzima extracelular. Para ello, 100 μ l de la fracción libre de células, 0.4 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 5.5 y 0.5 ml de sacarosa al 1% (p/v) en este mismo tampón, se mezclaron e incubaron a 42°C durante 90 minutos. Se observó actividad fructofuranosidasa desde el final de la fase de crecimiento logarítmico de los cultivos hasta el final de la fase estacionaria. Los máximos niveles de actividad (en torno a las 94 mU/ml) se obtuvieron durante la fase estacionaria.

Ejemplo 3

- 15 *Producción de actividad fructofuranosidasa en cultivos de distintas cepas de Rhodotorula crecidas en medio mínimo*

La actividad fructofuranosidasa se valoró en el medio extracelular de distintas cepas de *Rhodotorula* crecidas en 100 ml de medio mínimo para levaduras basados en maltosa: YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), maltosa al 1% (p/v). Se utilizaron las cepas de *R. mucilaginoso* (CECT 10044, CECT 10059, CECT 10087, 20 CECT 10291 y CECT 10359), *R. gracilis* ATCC 1416 y *R. rubra* ATCC 90687. Los cultivos se siguieron durante 45 horas. El crecimiento celular se valoró como en el Ejemplo 1. Se utilizaron matraces de vidrio de 250 ml, 30°C de temperatura y agitación orbital constante de 150 rpm. La fase estacionaria se alcanzó para todas las cepas utilizadas a una densidad óptica comprendida entre 4 y 4.6 UDO₆₆₀.

Ejemplo 4

Uso de la enzima para la producción de glucosa a partir de sacarosa con sobrenadante de distintas cepas de Rhodotorula crecidas en medio mínimo

30 Los sobrenadantes de los cultivos del Ejemplo 3 se utilizaron para la liberación de glucosa a partir de sacarosa por acción de la actividad fructofuranosidasa del sobrenadante donde se encuentra la enzima extracelular como en el Ejemplo 2. Se obtuvieron niveles valorables de actividad fructofuranosidasa desde la mitad de la fase de crecimiento logarítmico del cultivo hasta el final de la curva, durante unas 30 horas de cultivo. Los máximos niveles de actividad 35 (79-188 mU/ml) se obtuvieron durante la fase estacionaria de los cultivos para todas las cepas ensayadas. Los valores de mayor actividad invertasa se obtuvieron utilizando las cepas de *Rhodotorula* CECT 10359 (184 mU/ml) y ATCC 1416 (188 mU/ml).

Ejemplo 5

Producción de fructofuranosidasa a lo largo de cultivos de Rhodotorula crecidos en medio rico

45 Para la producción de fructofuranosidasa se cultivó *Rhodotorula gracilis* ATCC 1416 en 25 ml de medio (YEP) suplementado con maltosa: extracto de levadura (DIFCO) al 1% (p/v), bactopectona (DIFCO) al 2% (p/v), maltosa al 2% (p/v). Se utilizó un matraz de vidrio de 250 ml, 30°C de temperatura y agitación orbital constante de 230 rpm. El cultivo se siguió durante 57 horas. El crecimiento celular se realizó y valoró como en el ejemplo anterior. La fase estacionaria se alcanzó a las 25 horas de crecimiento, a 10.5 UDO₆₆₀.

Ejemplo 6

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

55 El sobrenadante del cultivo del Ejemplo 5 se utilizó para la liberación de glucosa a partir de sacarosa por acción de la actividad fructofuranosidasa del sobrenadante donde se encuentra la enzima extracelular como en el Ejemplo 2. Se obtuvieron niveles valorables de actividad beta- fructofuranosidasa desde la mitad de la fase de crecimiento logarítmico del cultivo hasta el final de la curva, durante unas 26 horas de cultivo. Los máximos niveles de actividad 60 (1.6 U/ml) se obtuvieron a 10.6 UDO₆₆₀.

Ejemplo 7

Estabilidad de la fructofuranosidasa de Rhodotorula a 4 y 22°C

65 La fracción extracelular de cultivo de *Rhodotorula* CECT 10359 se concentró 20 veces utilizando un sistema de filtración tangencial (filtros 30 kDa). Se obtuvo una preparación enzimática con una actividad de unas 1.7 U/ml. La preparación se mantuvo a 4 y 22°C durante 48 horas. Cada 1-4 horas se tomaron 20 μ l de la misma y se congeló a

ES 2 328 659 A1

una temperatura de -20°C. La actividad fructofuranosidasa sobre sacarosa, se valoró en todas las muestras obtenidas como en el Ejemplo 2. La pérdida de actividad obtenida a las dos temperaturas analizadas es prácticamente la misma (alrededor de un 20%) transcurridos los 2 días.

5

Ejemplo 8

Producción de fructofuranosidasa a lo largo de cultivos de Rhodotorula crecidos en medios mínimos basados en rafinosa y sacarosa

10

Para la producción de fructofuranosidasa se cultivó *Rhodotorula gracilis* ATCC 1416 en 25 ml de medio mínimo para levaduras basados en rafinosa o sacarosa: YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, DIFCO) al 0.7% (p/v), fuente de carbono al 1% (p/v). Se utilizó un matraz de vidrio de 250 ml, 30°C de temperatura y agitación orbital constante de 220 rpm. El cultivo se siguió durante 130 horas. El crecimiento celular se realizó y valoró como en el

15

Ejemplo 1. La fase estacionaria se alcanzó aproximadamente a las 120 horas de crecimiento, a 10 y 3 UDO₆₆₀ para sacarosa y rafinosa, respectivamente.

Ejemplo 9

20

Uso de la enzima para la producción de glucosa a partir de sacarosa con sobrenadante de medios basados en rafinosa y sacarosa

El sobrenadante del cultivo del Ejemplo 8 se utilizó para la liberación de glucosa a partir de sacarosa por acción de la actividad fructofuranosidasa del sobrenadante donde se encuentra la enzima extracelular como en el Ejemplo 2. Se obtuvieron niveles valorables de actividad beta-fructofuranosidasa al inicio de la fase estacionaria del cultivo, durante unas 60 horas de cultivo. Los máximos niveles de actividad: 0.67 U/ml para medios basados en sacarosa y 0.7 U/ml para los basados en rafinosa, se obtuvieron durante la fase estacionaria de los cultivos.

25

30

Ejemplo 10

Formación de fructooligosacáridos a 40°C a partir de sacarosa catalizada por la beta-fructofuranosidasa pura (F-2) de Rhodotorula

35

Se preparó una disolución de alta concentración de sacarosa (516 g/l) en tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.6. Se añadió la fructofuranosidasa pura, siendo la actividad final en la mezcla de 0.8 U/ml. La mezcla de reacción se incubó durante 71 horas a 40°C, con agitación orbital a 900 rpm. Pasado este tiempo, la mezcla se incubó 5 minutos a 80°C para inactivar la enzima, se diluyeron 1:2 (v/v) con agua, se centrifugaron 5 min a 6000 rpm en un tubo eppendorf con un filtro de 0.45 µm y se analizaron por cromatografía líquida HPLC. El perfil de los productos formados se aprecia en la Fig. 5. Se observa que la beta-fructofuranosidasa de *Rhodotorula* presenta actividad de transferencia (transfructosilación). Se obtienen tres trisacáridos: uno mayoritario, 6-kestosa y otros dos minoritarios, identificados como neokestosa y 1-kestosa. Además, se observa la presencia de dos tetrasacáridos (sin identificar) y de un disacárido que presumiblemente debe ser la blastosa. En este punto de máxima producción de FOS, la composición del sistema fue: 122.4 g/l fructosa, 165.1 g/l glucosa, 127.4 g/l sacarosa, 13.3 g/l blastosa, 61.7 g/l de 6-kestosa, 10.3 g/l neokestosa, 3.2 g/l 1-kestosa y 12.7 g/l tetrasacáridos.

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 659 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de un producto enzimático con actividad fructofuranosidasa, que comprende cultivar células de *Rhodotorula* en un medio mínimo o rico para levaduras basado en distintas fuentes de carbono (maltosa, rafinosa, sacarosa) a una temperatura comprendida entre 28 y 30°C y un rango de agitación orbital constante comprendido entre 150 y 250 rpm.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1 que comprende cultivar células de *Rhodotorula* en un medio para levaduras basado en maltosa, a una temperatura de 30°C y agitación orbital constante de 235 rpm.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que además comprende el paso de recuperar el producto enzimático del medio de cultivo y/o de las células.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las células de *Rhodotorula* pertenecen a una cepa seleccionada del grupo que consiste en *R. mucilaginoso* (CECT 10044, CECT 10059, CECT 10087, CECT 10291 y CECT 10359), *R. gracilis* ATCC 1416 y *R. rubra* ATCC 90687.
- 25 5. Producto enzimático con actividad fructofuranosidasa obtenible por el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 30 6. Producto enzimático según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la actividad fructofuranosidasa tiene baja especificidad de sustrato, actuando sobre sacarosa, 1-kestosa, nistosa, palatinosa, turanosa y leucrosa.
- 35 7. Producto enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, **caracterizado** porque no tiene actividad fructofuranosidasa sobre lactosa, maltosa y maltotriosa.
- 40 8. Producto enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la actividad fructofuranosidasa presenta un máximo en el intervalo de pH entre 4.5 y 5.5 a 42°C, y en un intervalo de temperatura de 40 a 60°C.
- 45 9. Producto enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, **caracterizado** porque tiene actividad fructosiltransferasa en presencia de uno o varios sustratos glucídicos.
- 50 10. Producto enzimático según la reivindicación 9, **caracterizado** porque los productos glucídicos son fructooligosacáridos.
- 55 11. Producto enzimático según la reivindicación 10, donde los productos resultantes de la actividad fructosiltransferasa son oligosacáridos con enlaces y β -2,1, y β -2,6.
- 60 12. Producto enzimático según la reivindicación 11, donde el producto resultante de la actividad fructosiltransferasa es básicamente la 6-kestosa.
- 65 13. Procedimiento de obtención de oligosacáridos que comprende permitir que el producto enzimático definido en cualquiera de las reivindicaciones 5-12 actúe sobre uno o varios sustratos glucídicos.
- 70 14. Procedimiento de obtención de una enzima sustancialmente pura con actividad fructofuranosidasa, a partir del producto enzimático obtenido por el procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, que comprende la etapa adicional de purificar el producto enzimático hasta obtener la enzima sustancialmente pura.
- 75 15. Procedimiento según la reivindicación 14, donde las células de *Rhodotorula* pertenecen a una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Rhodotorula mucilaginoso* (CECT 10044, CECT 10059, CECT 10087, CECT 10291 y CECT 10359), *Rhodotorula gracilis* ATCC 1416 y *Rhodotorula rubra* ATCC 90687.
- 80 16. Enzima sustancialmente pura con actividad fructofuranosidasa obtenible por el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15.
- 85 17. Enzima según la reivindicación 16, **caracterizada** porque la actividad fructofuranosidasa tiene baja especificidad de sustrato, actuando sobre sacarosa, rafinosa, 1-kestosa, nistosa, palatinosa, turanosa y leucrosa.
- 90 18. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, **caracterizada** porque no tiene actividad fructofuranosidasa sobre lactosa, maltosa y maltotriosa,
- 95 19. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 16-18, donde la actividad fructofuranosidasa presenta un máximo en el intervalo de pH entre 4.5 y 5.5 a 42°C, y en un intervalo de temperatura entre 40 y 60°C.
- 100 20. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, **caracterizada** porque tiene actividad fructosiltransferasa en presencia de uno o varios sustratos glucídicos.

ES 2 328 659 A1

21. Enzima según la reivindicación 20, **caracterizada** porque los productos glucídicos son fructooligosacáridos.

22. Enzima según la reivindicación 21, donde los productos resultantes de la actividad fructosiltransferasa son oligosacáridos con enlaces β -2,1, y β -2,6.

5

23. Enzima según la reivindicación 22, donde los productos resultantes de la actividad fructosiltransferasa son básicamente 6-kestosa, neokestosa y 1-kestosa.

24. Enzima según cualquiera de las reivindicaciones 16-23, **caracterizada** por tener un peso molecular en condiciones desnaturalizantes de 172 kDa.

10

25. Procedimiento de obtención de oligosacáridos que comprende permitir que la enzima definida en cualquiera de las reivindicaciones 16-24 actúe sobre uno o varios sustratos glucídicos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

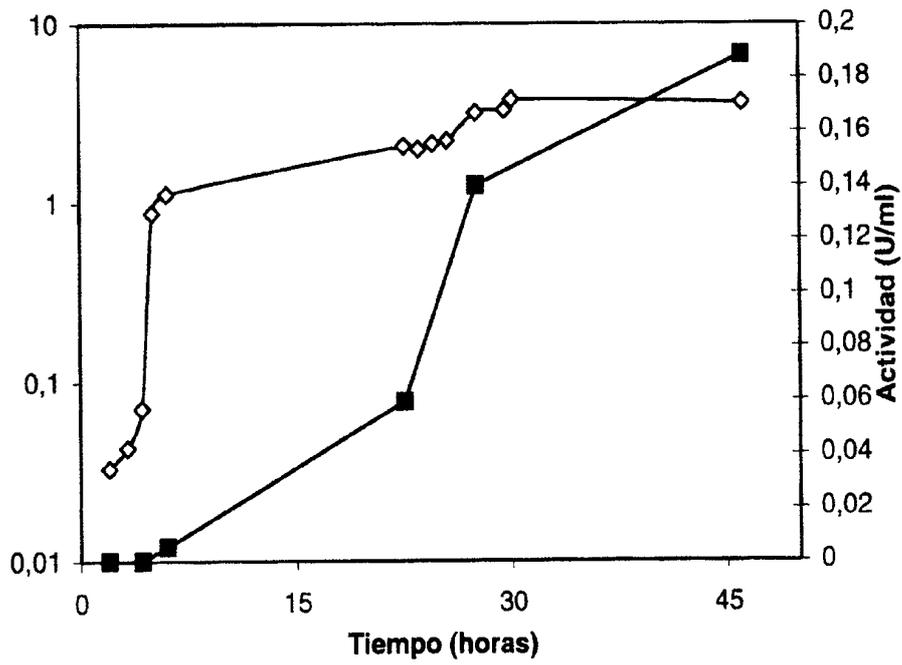


FIG. 2

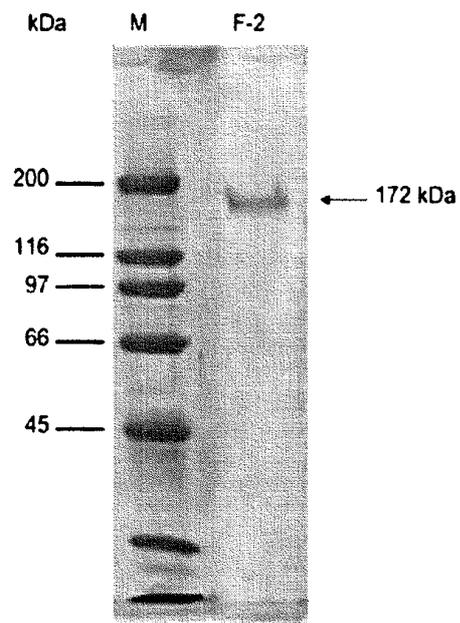
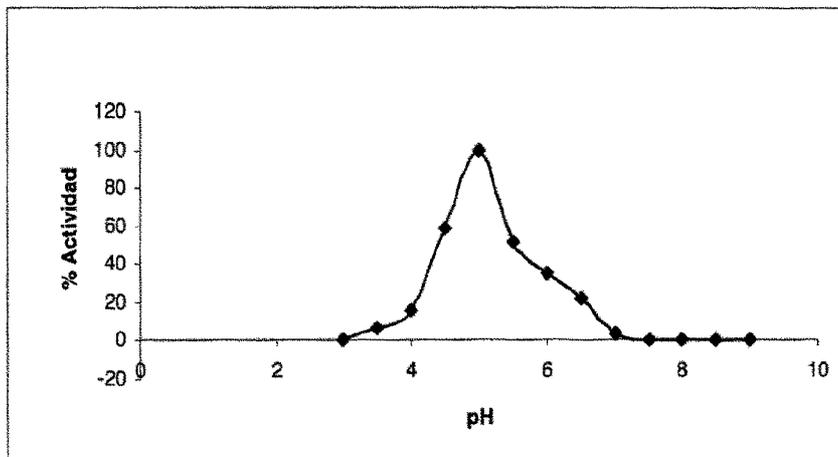


FIG. 3

A



B

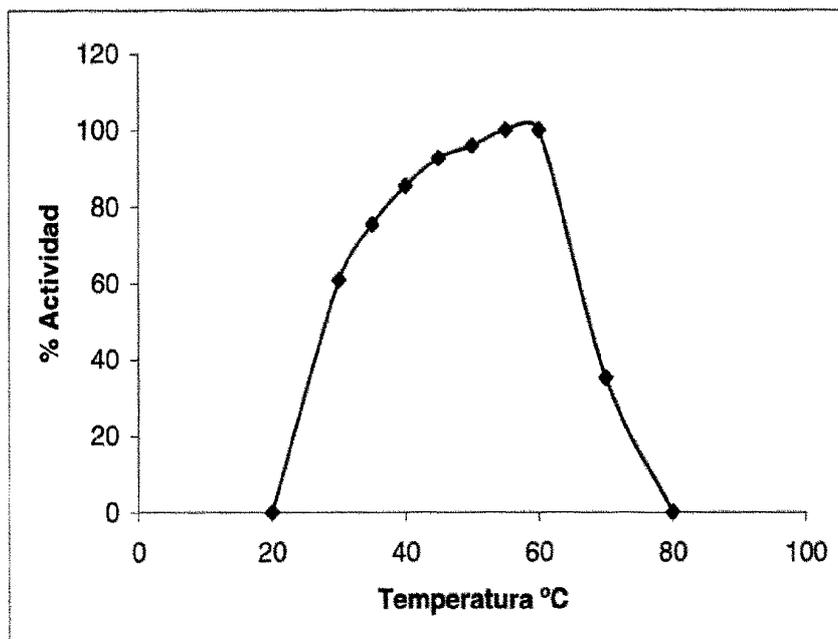


FIG. 4

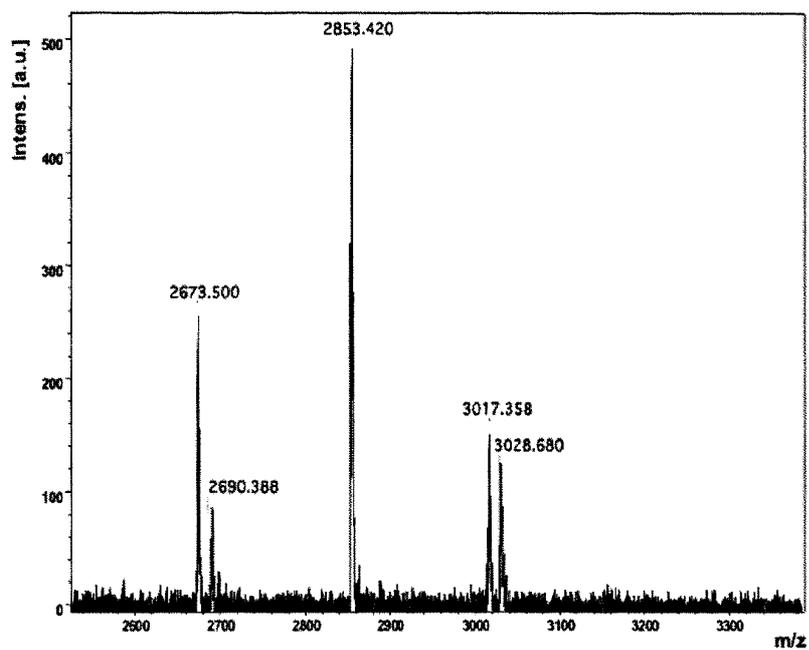


FIG. 5

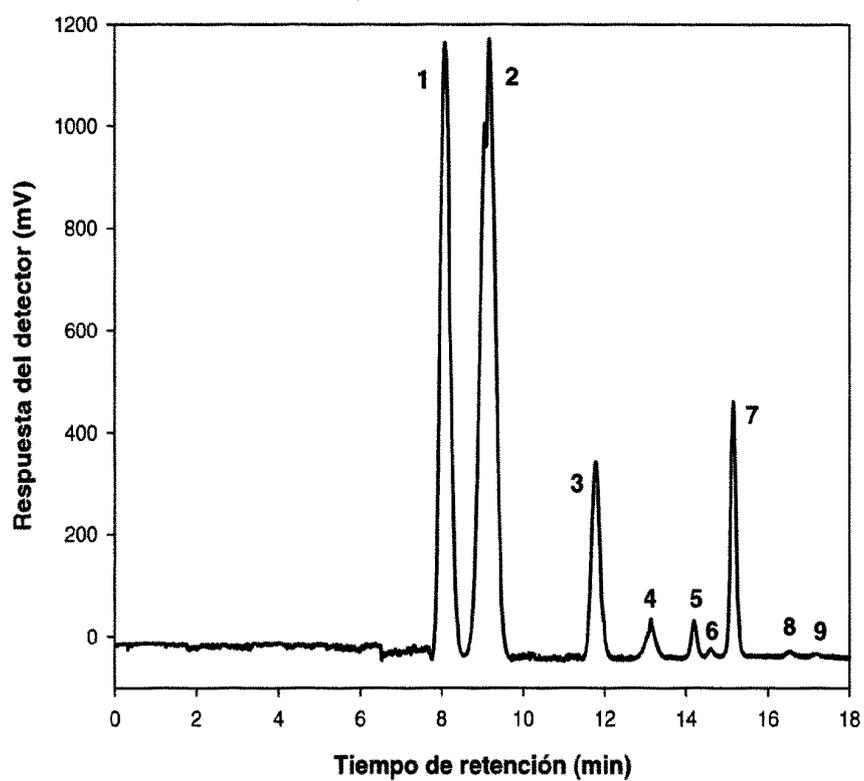


FIG. 6

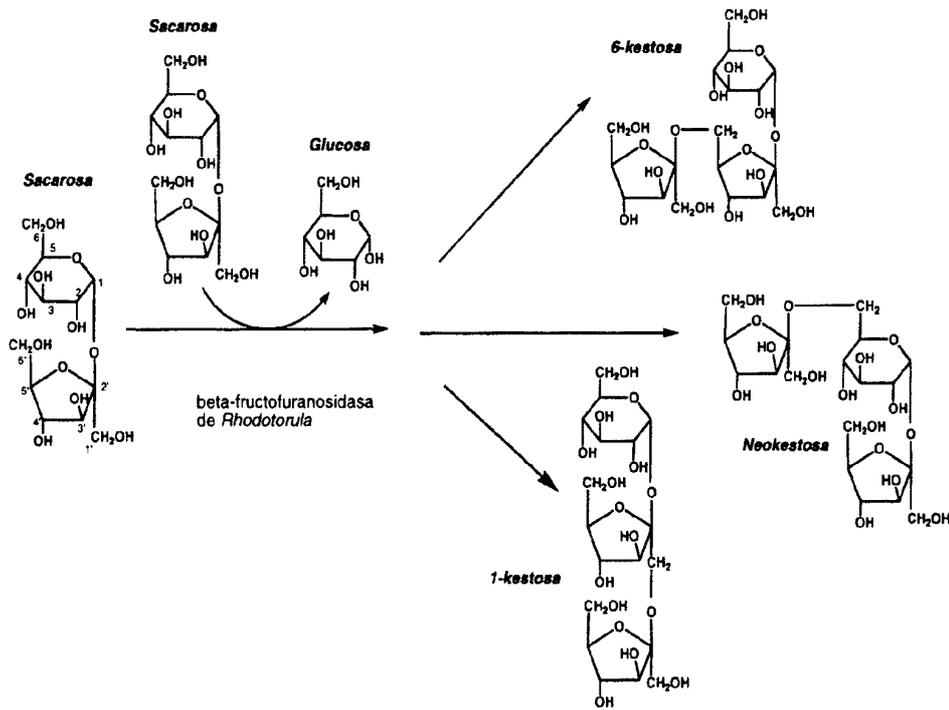


FIG. 7

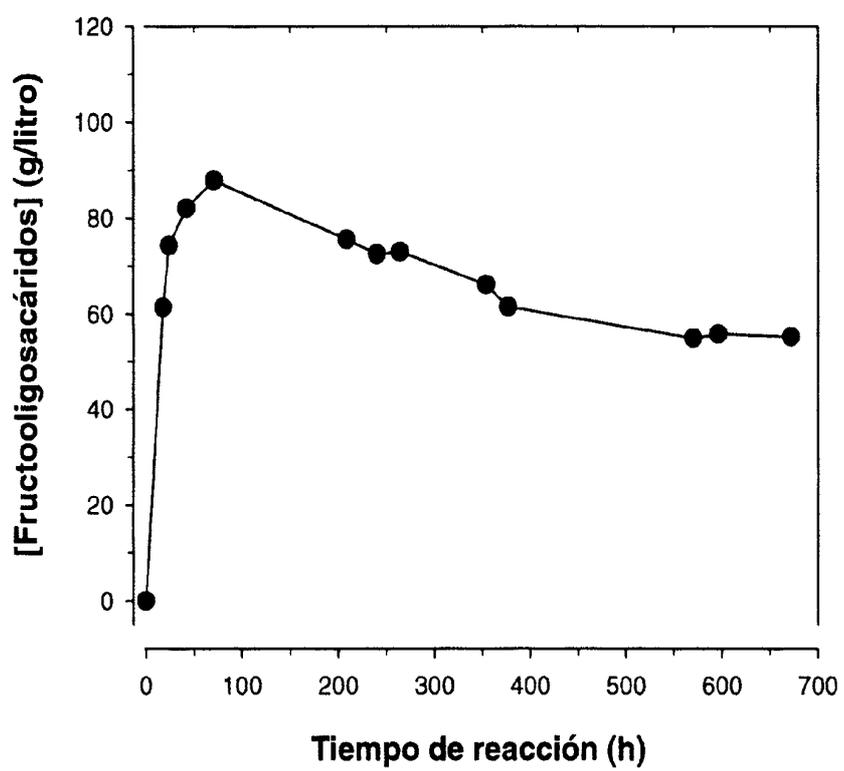
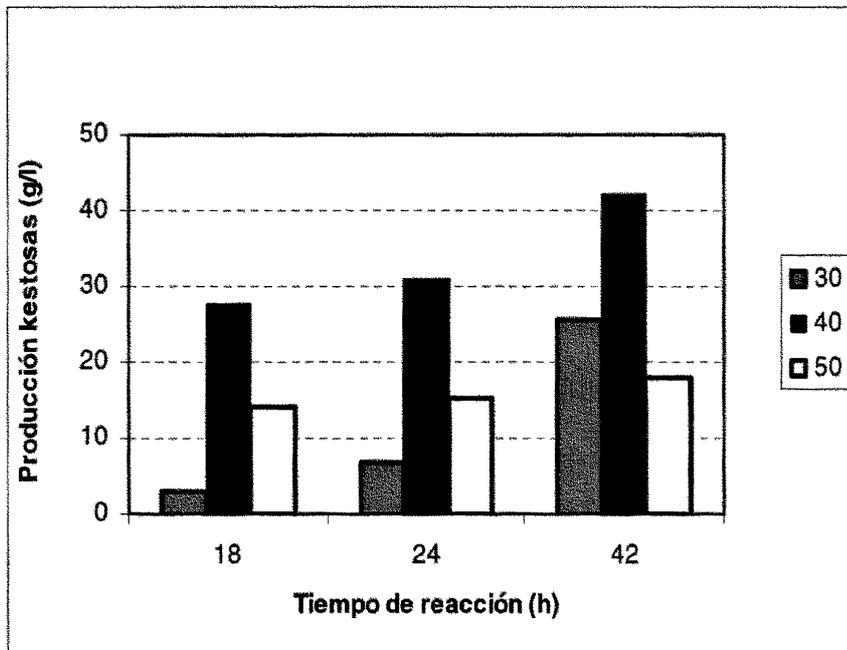
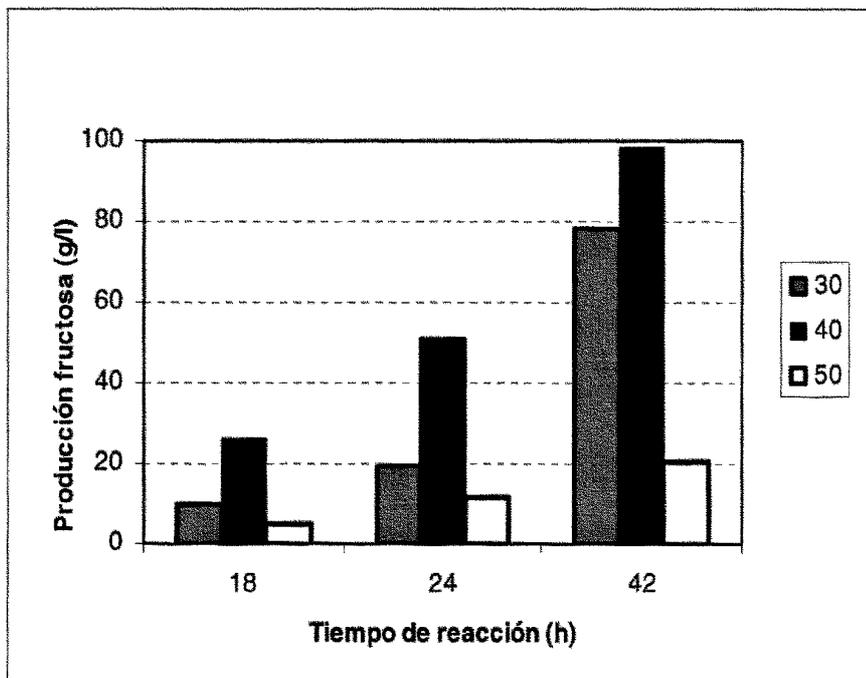


FIG. 8

A



B





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 328 659

⑫ Nº de solicitud: 200801401

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.05.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MAUGERI, F. et al. Screening of Yeast Strains for Transfructosylating Activity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Agosto 2007. Volumen 49, páginas 43-49. En particular página 43, columna 2, página 44, página 55 columna 1 párrafos 1 y 2, columna 2 párrafos 2 y 3, página 47, página 48 columna 2 párrafo 3.	1-3,5-6, 8-10,14, 16-19
Y		4,20-21,25
Y	FERNÁNDEZ-ARROJO, L. On the Fructosylation Activity and Selectivity of Microbial Beta-fructofuranosydases for the Production of Prebiotics. Abstracts. Journal of Biotechnology. Julio 2007. Volumen 131S, S98-S121.	4,13-15
Y	ÁLVARO-BENITO, M. et al. Characterization of a Beta-fructofuranosidase from <i>Schwanniomyces occidentalis</i> with Transfructosylating Activity Yielding the Prebiotic 6-Kestose. Journal of Biotechnology. Julio 2007. Volumen 132, páginas 75-81.	13-15, 20-21,25
A		1-25
X	RUBIO, M. et al. Invertase from a Strain of <i>Rhodotorula glutinis</i> . Phytochemistry. 2002. Volumen 61, páginas 605-609. En particular, página 606, columna 2; página 607, columna 2; página 608, columna 1.	1-3,5-8, 16-19

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

11.09.2009

Examinador

N. Urquía Fernández

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPOAC, XPAIP, XPESP, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, ISPEC, MEDLINE, PUBCHEM, GOOGLE SCHOLAR, PAPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4, 11-13, 15, 20-24	SÍ
	Reivindicaciones	1-3, 5-10, 14, 16-19	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	11-12, 22-24	SÍ
	Reivindicaciones	1-10,13-21, 25	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MAUGERI, F. et al. Screening of Yeast Strains for transfructosylating Activity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Agosto 2007. Volumen 49, páginas 43-49. En particular página 43, columna 2, página 44, página 55 columna 1 párrafos 1 y 2, columna 2 párrafos 2 y 3, página 47, página 48 columna 2 párrafo 3.	08-2007
D02	FERNÁNDEZ-ARROJO, L. On the Fructosylation Activity and Selectivity of Microbial Beta-fructofuranosydases for the Production of Prebiotics. Abstracts. Journal of Biotechnology. Volumen 131S, S98-S121.	07-2007
D03	ÁLVARO-BENITO, M. et al. Characterization of a Beta- fructofuranosidase from <i>Schwanniomyces occidentalis</i> with Transfructosylating Activity Yielding the Prebiotic 6-Kestose. Journal of Biotechnology. Volumen 132, páginas 75-81.	07-2007
D04	RUBIO, M. et al. Invertase from a Strain of <i>Rhodotorula glutinis</i> . Phytochemistry. Volumen 61, páginas 605-609. En particular página 606 columna 2, página 607 columna 2, página 608 columna 1.	2002

Observaciones sobre documentos:

D01 describe la identificación de enzimas con actividad fructosil transferasa y fructofuranosidasa en *Rhodotorula* sp.

D02 describe la identificación de una enzima con actividad beta-fructosil transferasa en cultivos de *Rhodotorula gracilis*.

D03 describe una actividad enzimática beta fructofuranosidasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* con actividad fructosil transferasa.

D04 describe una enzima con actividad invertasa o beta-d-fructofuranosidasa aislada de cepas de *Rhodotorula glutinis*.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Novedad y actividad inventiva conforme a los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes respectivamente.

Reivindicaciones 1-3, 5-10, 14, 16-19

El estado de la técnica más cercano al objeto de la invención está contenido en el documento D01, que describe un procedimiento para la obtención de un producto enzimático con una actividad beta fructofuranosidasa y una actividad beta-d-fructosil transferasa a partir del cultivo de dos cepas de *Rhodotorula* sp. utilizando como fuente de carbono sacarosa, a pH 5.5, 150 rpm y 25°C, de forma idéntica a la descrita en la reivindicación 1. El procedimiento descrito incluye la adición de maltosa al cultivo a través de la adición de extracto de malta (página 44) y la recuperación de la enzima del medio de cultivo libre de células al igual que se describe en las reivindicaciones 2 y 3. Las actividades enzimáticas se testaron por incubación de la enzima en medio rico en sacarosa, pH4.5 y 50°C durante 72 horas.

En D01, el producto enzimático de LEB-U5 y LEB V-10, ambas cepas de *Rhodotorula*, actúa sobre sustratos de sacarosa, 1-kestosa, y nistosa (página 45 y 48), de forma idéntica a la descrita en la Reivindicación 6. La máxima actividad enzimática se presenta a pH 4.5 y 50°C, tal como se describe en la reivindicación 8. El producto enzimático tiene asimismo actividad fructosiltransferasa en presencia de uno o varios fructooligosacáridos al igual que en la reivindicación 10, actuando sobre enlaces beta 2-1 (1-kestosa, nistosa, fructofuranosil-nistosa), pero no beta 2-6 (6 kestosa).

Hoja adicional

El documento D03 divulga igualmente la identificación de una actividad enzimática fructofuranosidasa de *Rhodotorula*, cuya actividad óptima se desarrolla a un pH de 4.5, y es estable a 60°C, obtenida por cultivo de *Rhodotorula* a 30°C y agitación a 250rpm con maltosa, rafinosa o sacarosa como fuentes de carbono, tal como se describe en las reivindicaciones 1 a 3 y reivindicación 8. El producto enzimático obtenido del medio como sobrenadante actúa sobre sustrato de sacarosa, pero no sobre maltosa, lactosa o maltotriosa, tal como se define en reivindicaciones 5, 6 y 7. En D03 se describe un procedimiento de purificación de la enzima que permite obtenerla en estado sustancialmente puro, tal como se describe en la reivindicación 14 y 16 a 19.

Las Reivindicaciones 1 a 3, 5 a 10, 14 y 16 a 19 no poseen, por tanto, novedad conforme al Artículo 6 de la Ley de Patentes.

Reivindicaciones 4, 13-15, 20-21, 25

En D02 se divulga la purificación de una enzima beta-fructofuranosidasa extracelular con actividad fructosil transferasa de cultivos de *Rhodotorula gracilis*, que produce como resultado de su actividad una mezcla compleja de di-tri y tetrasacáridos. Esta información combinada con los métodos conocidos de producción de la enzima divulgados en D01, y los métodos de purificación conocidos divulgados en D03 elimina la actividad inventiva de las reivindicaciones 4 y 13-15.

En D01 se describe como ya se indicó anteriormente una actividad fructosil transferasa de *Rhodotorula* capaz de actuar sobre uno o varios sustratos glucídicos dando lugar a la producción de fructooligosacáridos. Esta información combinada con los métodos de purificación conocidos y descritos en D03 elimina la actividad inventiva de las reivindicaciones 20, 21 y 25.

Las reivindicaciones 4, 13 a 15, 20, 21 y 25 carecen, por tanto, de actividad inventiva conforme al Artículo 8 de la ley de Patentes.

Reivindicaciones 11, 12, 22-24

Los documentos citados que mencionan la identificación y purificación de las enzimas de *Rhodotorula* no hacen referencia a la actividad específica frente a enlaces beta 2-6 ni a la producción de 6-kestosa como resultado de la actividad fructosiltransferasa. Tampoco se ha encontrado en el estado de la técnica una enzima fructofuranosidasa de *Rhodotorula* con un peso molecular de 172 KDa. Las reivindicaciones 11, 12, y 22-24 poseen por tanto novedad y actividad inventiva conforme a los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes respectivamente.

Aplicación industrial conforme al Artículo 9 de la Ley de Patentes.

Las reivindicaciones 1-25 son susceptibles de aplicación industrial conforme al Artículo 9 de la Ley de Patentes.