



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 163 644**

51 Int. Cl.:
A23L 1/0524 (2006.01)
A23C 9/137 (2006.01)
A23C 9/154 (2006.01)
A23C 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **96925730 .2**
96 Fecha de presentación : **12.07.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **0839006**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.1998**

54 Título: **Procedimiento para la estabilización de proteínas en un medio ácido con una pectina muy esterificada.**

30 Prioridad: **14.07.1995 GB 9514438**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.02.2002**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **29.10.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **29.10.2010**

73 Titular/es: **DANISCO A/S**
Langebrogade 1, P.O. Box 17
1001 Copenhagen K., DK

72 Inventor/es: **Christensen, Tove, Martel, Ida, Elsa;**
Kreiberg, Jette, Dina;
Thorsoe, Hanne;
Buchholt, Hans, Christian;
Rasmussen, Preben y
Nielsen, John

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 163 644 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la estabilización de proteínas en un medio ácido con una pectina muy esterificada.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y a un enzima para su utilización en dicho procedimiento.

En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar y utilizar una pectina modificada enzimáticamente.

10 La pectina es un producto importante en la industria actual. Por ejemplo, puede utilizarse en la industria de la alimentación como un agente espesante o gelificante, tal como en la preparación de mermeladas.

15 La pectina es un polisacárido estructural que se encuentra habitualmente en forma de protopectina en las paredes celulares vegetales. La estructura de la pectina comprende residuos de ácido galacturónico con uniones α -1-4 que están interrumpidos con un número escaso de unidades de α -L-ramnosa con uniones 1,2. Además, la pectina comprende regiones muy ramificadas con una cadena ramno-galacturónica casi alternativa. Estas regiones muy ramificadas contienen también otras unidades de hidratos de carbono (tales como D-galactosa, L-arabinosa y xilosa) unidas mediante engarces glicosídicos a los átomos C3 ó C4 de las unidades de ramnosa o a los átomos C2 ó C3 de las unidades de ácido galacturónico. A las cadenas largas de residuos de ácido galacturónico con uniones α -1-4 se alude habitualmente como regiones "lisas", mientras que a las regiones muy ramificadas se alude como "regiones peludas".

20 Algunos de los grupos carboxílicos de los residuos galacturónicos están esterificados (por ejemplo, los grupos carboxílicos están metilados). La esterificación de los grupos carboxílicos tiene lugar típicamente después de la polimerización de los residuos de ácido galacturónico. Sin embargo, es extremadamente raro que todos los grupos carboxílicos estén esterificados (por ejemplo, metilados). Habitualmente, el grado de esterificación variará entre 0 y 90%. Si el 50% o más de los grupos carboxílicos están esterificados, entonces se aludirá a la pectina resultante como una "pectina muy esterificada" (abreviadamente "pectina HE") o una "pectina muy metoxilada". Si menos del 50% de los grupos carboxilos están esterificados, entonces se aludirá a la pectina resultante como a una "pectina poco esterificada" (abreviadamente, "pectina LE") o "retina poco metoxilada". Si la pectina no contiene ningún grupo -o sólo algunos- grupos esterificados, se alude habitualmente a la misma como ácido pectico.

25 La estructura de la pectina, en particular el grado de esterificación (por ejemplo, metilación), dicta muchas de sus propiedades resultantes físicas y/o químicas. Por ejemplo, la gelificación de la pectina depende de su naturaleza química, en particular de su grado de esterificación. Además, sin embargo, la gelificación pectínica depende también del contenido de sólidos solubles, del pH y de la concentración de iones cálcicos. Respeto a esta última, se cree que los iones cálcicos forman complejos con los grupos carboxílicos libres, particularmente los que se encuentran en una pectina LE.

30 Los enzimas pécticos se clasifican según su manera de atacar la parte galacturónica de la molécula de la pectina. Una revisión de algunos enzimas pécticos se ha preparado por Pilnik y Voragen (Food Enzymology, Ed.: P.F. Fox; Elsevier (1991); pp. 303-337). En particular, las metilesterasas pectínicas (EC 3.1.1.11), a las que se alude de otra forma como PMEs, desesterifican las pectinas HE a pectinas LE o a ácidos pécticos. En cambio, y a título de ejemplo, las despolimerasas pectínicas seccionan los engarces glicosídicos entre los residuos metiléster galacturonosilo.

35 Más detalladamente, la actividad PME produce grupos libres carboxílicos y metanol libre. El aumento en los grupos carboxílicos libres puede monotorizarse fácilmente mediante titulación automática. A este respecto, estudios anteriores han mostrado que algunas PME desesterifican las pectinas al azar, en el sentido de que desesterifican cualquiera de los residuos de ácido galacturónico esterificados (por ejemplo, metilados) o más de una de las cadenas pectínicas. Ejemplos de PME que desesterifican pectinas al azar pueden obtenerse a partir de orígenes fúngicos tales como *Aspergillus aculeatus* (véase WO 94/255575) y *Aspergillus japonicus* (Ishii *et al.* J. Food Sci. 44, pp. 611-14). Baron *et al.* (Lebensm. Wiss. M-Technol. 13 pp. 330-333) aislaron aparentemente una PME fúngica a partir de *Aspergillus niger*. Se informó de que esta PME fúngica tenía un peso molecular de 39000 D, un punto isoeléctrico de 3,9, un pH óptimo de 4,5 y un valor K_m de 3 (mg/ml).

40 En cambio, algunas PME son conocidas por desesterificar pectinas de una forma en bloque, en el sentido de que se cree que atacan a las pectinas, bien en los extremos no reductores, o cerca de los grupos carboxilo libres, prosiguiendo entonces a lo largo de las moléculas de aquéllas mediante un mecanismo de cadena única, creando por tanto bloques de unidades de ácido galacturónico no esterificadas que son muy sensibles al calcio. Ejemplos de tales enzimas que desesterifican enzimáticamente en bloque las pectinas, son PME vegetales. Se ha sugerido que existen en los cítricos hasta 12 isoformas de PME (Pilnik W. y Voragen (Food Enzymology (Ed.: P.F.Fox); Elsevier (1991); pp. 303-337). Estas isoformas tienen diferentes propiedades.

45 Versteeg *et al.* (J. Food Sci. 45 pp. 969-971) han aislado aparentemente una PME de la naranja. Se informa que la PME vegetal se presenta en múltiples isoformas de propiedades distintas. La isoforma I posee un peso molecular de 36000 D, un punto isoeléctrico de 10,0, un pH óptimo de 7,6 y un valor K_m (mg/ml) de 0,083. La isoforma II posee un peso molecular de 36200 D, un punto isoeléctrico de 11,0, un pH óptimo de 8,8 y un valor K_m (mg/ml) de 0,0046. La isoforma III (HMW-PE) posee un peso molecular de 54000 D, un punto isoeléctrico de 10,2, un pH óptimo de 8 y un valor K_m (mg/ml) de 0,041. Sin embargo, hasta la fecha, existen datos secuenciales muy limitados de tales PME.

Según Pilnik y Voragen (*ibid*), las PME puede encontrarse en diversas otras plantas superiores, tales como manzanas, albaricoques, aguacates, plátanos, fresas, lima, pomelos, mandarinas, cerezas, grosellas, uvas, mangos, papayas, fruta de la pasión, melocotones, peras, ciruelas, alubias, zanahorias, coliflores, pepinos, puerros, cebollas, guisantes, patatas, rábanos y tomates. Sin embargo, del mismo modo, hasta la fecha, existen datos secuenciales muy limitados de tales PMEs.

La distribución de los grupos carboxílicos libres al azar o en bloque puede distinguirse mediante la cromatografía de intercambio iónico de alta resolución (Schols *et al.* Food Hydrocolloids 1989 6, pp. 115-121). Estos ensayos se utilizan a menudo para verificar la actividad PME residual indeseable en jugos de cítricos después de pasteurización, porque la PME residual puede provocar lo que se denomina “pérdida del enturbiamiento” en el jugo de naranja, además de la creación en éste de metanol.

Las PMEs tienen usos importantes en la industria. Por ejemplo, pueden utilizarse en o como agentes secuestrantes para los iones cálcicos. A este respecto, y según Pilnik y Voragen (*ibid*), la alimentación del ganado puede prepararse añadiendo una lechada de hidróxido cálcico a peladuras de cítricos después de la extracción del jugo. Después de su adición, el pH alto y los iones cálcicos activan cualquier PME original en las peladuras, provocando la desesterificación rápida de la pectina, teniendo lugar la coagulación del pectato cálcico. La fase líquida unida se libera y se extrae fácilmente por prensado, de forma que sólo una fracción del contenido acuoso original necesita eliminarse mediante un costoso secado térmico. El jugo del prensado se utiliza entonces como comida para los animales.

Pilnik y Voragen (*ibid*) listan los usos de las PMEs endógenas que incluyen su adición a los jugos de frutas para reducir la viscosidad de éstos si incluyen demasiada pectina derivada de la fruta, su adición como soluciones de pectinasa a las burbujas de gas en la cáscara blanquecina del fruto de los cítricos que se ha calentado hasta obtener una temperatura del núcleo de 20 a 40°C con objeto de facilitar la eliminación de la piel y de otras membranas de los gajos intactos del jugo (US-A-4284651) y su utilización para proteger y mejorar la textura y firmeza de diversos frutos y vegetales procesados, tales como la manzana (Wiley & Lee, 1970, Food Technol. 24, 1168-70), tomates enlatados (Hsu *et al.* 1965 J. Food Sci. 30 pp. 583-588) y patatas (Bartolome & Hoff 1972, J. Agric. Food Chem. 20, pp. 262-266).

Glahn y Rolin (1994 Food Ingredients Europe, Conf Proceedings pp. 252-256) informan de la aplicación hipotética de la “pectina GENU tipo YM-100” para interaccionar con bebidas de leche agriada. No se presentan detalles en absoluto sobre cómo se prepara la pectina GENU de tipo YM-100.

El documento EP-A-0664300 da a conocer un procedimiento de fraccionamiento químico para preparar pectina sensible al calcio. Se afirma que la pectina sensible al calcio es ventajosa para la industria de la alimentación.

De este modo, pectinas y pectinas desesterificadas, además de las PMEs, poseen una importancia industrial. Además, existe una necesidad constante de mejorar los procedimientos conocidos para estabilizar las proteínas en un entorno ácido, pero sin afectar adversamente la viscosidad de este entorno. A este respecto, un efecto adverso sobre la viscosidad del entorno puede comprometer la apariencia completa y/o la textura y/o el sabor agradable y/o la sensación en la boca del producto resultante.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento como se expone en la reivindicación 1.

Así, en la presente memoria se describe una nueva utilización de pectinas desesterificadas y una nueva PME recombinante para preparar tales pectinas.

Algunas de las ventajas clave de la presente invención consisten en que la pectina desesterificada de la presente invención ofrece estabilidad a las proteínas en un entorno ácido, sin afectar de forma adversa a la viscosidad de éste.

El término “pectina desesterificada enzimáticamente en bloque utilizando técnicas de ADN recombinante” significa una pectina que contiene grupos desesterificados en bloque, en el que la pectina se prepara tratando (por ejemplo, poniendo en contacto) una pectina que contiene grupos esterificados con un enzima que se ha preparado utilizando las técnicas del ADN recombinante.

Algunas de las ventajas clave de este aspecto preferido de la presente invención consisten en que la pectina desesterificada puede prepararse con facilidad y con un grado relativo de consistencia. A este respecto, la misma PME recombinante puede prepararse bastante simple y fácilmente, y también hasta un alto grado de homogeneidad. Esto a su vez, y de forma distinta a las preparaciones PME de la técnica anterior, significa que la actividad PME resultante es más consistente y homogénea, lo cual permite que el proceso completo de desesterificación esté más controlado.

La utilización de una pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, -que se prepara preferentemente utilizando técnicas del ADN recombinante- en el procedimiento de la presente invención, para estabilizar por lo menos una proteína en un medio ácido, es beneficiosa, ya que permite que proteínas tales como las del suero y de la leche (tal como la caseína) sean estables en soluciones ácidas. Esto resulta importante para el mercado de bebidas, tales como la leche desnatada, jugos de frutas y bebidas de proteínas séricas, en el que antes únicamente resultaba posible conservar el sabor de las proteínas clave bajo condiciones de acidez alta, tales como pH 4,2 - si se encontraban presentes grandes cantidades de estabilizantes.

ES 2 163 644 T5

Ahora hemos encontrado que para algunas aplicaciones, pueden utilizarse pequeñas cantidades de la pectina desesterificada según la presente invención. A estos bajos niveles, la pectina desesterificada según la presente invención no sólo actúa como un estabilizador, sino que tampoco tiene un efecto adverso sobre el producto final.

5 Si se deseara, la utilización de la pectina desesterificada de la presente invención permitiría a los fabricantes de productos alimentarios tales como bebidas, aumentar su pH. A este respecto, en algunos casos la naturaleza menos ácida de las bebidas puede hacerlas de sabor más agradable para la gente, especialmente para los niños. De este modo, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, resulta ahora posible conservar el sabor de aquéllas proteínas con condiciones de pH más altas que 4,2, tales como de hasta pH 5,5 (p. ej. pH 5,2), utilizando la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, particularmente la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque y preparada por la utilización de las técnicas del ADN recombinante.

10 Además, se cree que incluso bajo condiciones de pH bajo, tales como pH 4,2 o inferiores, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, particularmente la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque preparada utilizando las técnicas del ADN recombinante, estabiliza la proteína (o proteínas) en mayor medida que los estabilizadores de la técnica anterior que se utilizan para estas condiciones de pH.

20 Otra ventaja consiste en que la PME recombinante es capaz de producir una pectina sustancialmente homogénea desesterificada en bloque. Con esto se quiere decir que sustancialmente, todas las cadenas pécticas comprenden por lo menos dos grupos carboxilos adyacentes desesterificados. Sin embargo, para algunas aplicaciones puede no resultar necesario preparar o utilizar tal pectina homogénea desesterificada en bloque.

25 Sin querer teorizar, se cree que la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, particularmente la preparada mediante la utilización de técnicas de ADN recombinante, estabiliza la proteína (o proteínas) rodeando a ésta (o éstas) de una capa de cargas negativas, formando de este modo una emulsión estable.

30 El procedimiento de la presente invención es útil para desesterificar las pectinas en bloque cuando éstas se ponen en contacto con el enzima PME recombinante en un medio sustancialmente acuoso. En algunos casos, las pectinas desesterificantes pueden aumentar la sensibilidad a los iones calcio de una pectina, lo cual a su vez puede resultar ventajoso.

35 Alternativamente, el procedimiento de la presente invención es útil para esterificar pectinas cuando éstas se ponen en contacto con el enzima PME recombinante en un medio sustancialmente no acuoso, tal como en presencia de metanol o de altas concentraciones de sulfato amónico. Este aspecto es ventajoso si, por ejemplo, se desea reducir la sensibilidad al calcio de una pectina.

40 Este procedimiento de esterificar pectinas es ventajoso, porque evita la necesidad de las condiciones de alta temperatura y de esterificación del metanol asociadas con los procedimientos de la técnica anterior. Así, se describe en la presente memoria la utilización de dicha pectina esterificada en la preparación de un producto alimenticio, así como la pectina en sí misma.

Según la presente invención, la pectina desesterificada de la presente invención es ventajosa para la preparación de un producto alimenticio.

45 Los productos alimenticios típicos incluyen productos lácteos, cárnicos, aves de corral, de pescado y de panadería. Preferentemente, el producto alimenticio es una bebida.

50 La pectina desesterificada preparada de la presente invención es también ventajosa para uso como estabilizador y/o modificador de la viscosidad en la preparación de especialidades farmacéuticas, aplicaciones farmacéuticas, cosméticos y aplicaciones de éstos.

Preferentemente, el entorno ácido es una solución acuosa.

55 Preferentemente, la solución acuosa es una bebida.

Preferentemente, la bebida es un yoghurt líquido, un zumo de frutas o una bebida que contiene proteínas del suero.

60 Preferentemente, la proteína se deriva o es derivable de los productos lácteos, tales como leche o queso.

Preferentemente, la proteína es caseína o proteína sérica.

Preferentemente, el entorno ácido tiene un pH de entre 3,5 y 5,5 aproximadamente.

65 Preferentemente, el entorno ácido tiene un pH de entre 4 y 5,5 aproximadamente.

Preferentemente, en el que el entorno ácido tiene un pH de 4 aproximadamente.

ES 2 163 644 T5

Preferentemente, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, particularmente la preparada mediante técnicas del ADN recombinante, está muy esterificada, conteniendo un 80% aproximadamente de grupos éster o menos (es decir, un grado de esterificación (DE) del 80% o menos), preferentemente un 75% aproximadamente de grupos éster o menos (es decir, un DE de 75% aproximadamente o menos). A este respecto, la proporción de los grupos carboxílicos libres a los grupos carboxílicos esterificados en la pectina está entre 1:1 y 1:4, preferentemente entre 1:2 y 1:3.

Preferentemente, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque contiene aproximadamente un 76% de grupos éster.

En algunos casos, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque es sensible a los iones Ca^{2+} . La sensibilidad a éstos puede determinarse siguiendo el Protocolo que se menciona en los Ejemplos.

Más preferentemente, sin embargo, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, particularmente la preparada mediante las técnicas del ADN recombinante, no es sensible a los iones de Ca^{2+} . La no sensibilidad al calcio puede determinarse siguiendo el Protocolo que se menciona en los Ejemplos.

Preferentemente, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque posee un peso molecular alto.

Típicamente, el peso molecular se encuentra entre 50 KD y 150 KD aproximadamente.

Preferentemente, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque se prepara tratando una pectina con una pectin metil esterasa recombinante que desesterifica dos o más residuos adyacentes de ácido galacturónico de la pectina en la totalidad, al menos sustancialmente, de las cadenas pectínicas.

Preferentemente, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque se prepara tratando la pectina con la pectin metil esterasa recombinante en presencia de iones sódicos.

Preferentemente, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque preparada mediante técnicas del ADN recombinante, se prepara tratando la pectina con la pectin metil esterasa recombinante en presencia de NaCl , NaNO_3 ó Na_2SO_4 .

El término "pectina" incluye la pectina con su significado normal, así como su fraccionamiento y derivados, así como las pectinas modificadas (por ejemplo, las pectinas modificadas química y enzimáticamente).

Preferentemente, la pectina no es una pectina que se haya tratado previamente con el enzima poligalacturonasa para reducir sustancialmente la longitud de la matriz pectínica.

El término "homólogo" respecto al enzima recombinante para su utilización en el procedimiento de la presente invención, incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) aminoácido(s) a partir de o a la secuencia, siempre que la secuencia aminoácida resultante posea actividad PME, preferentemente al menos la misma que un enzima recombinante que incluya alguna o varias de las secuencias que se muestran como SEC ID n° 1 y N° 2. El término "homólogo" abarca la homología respecto a estructura y/o función, siempre que el enzima recombinante resultante posea actividad PME y en el que la secuencia de aminoácidos presenta por lo menos el 75%, más preferentemente de al menos el 85%, más preferentemente de al menos el 90% respecto a las secuencias que se muestran como SEC ID n° 1 y SEC ID N° 2.. Más preferentemente, existe una homología de al menos el 95%, más preferentemente de al menos el 98%, respecto a las secuencias que se muestran como SEC ID n° 1 y SEC ID n° 2.

Los términos anteriores son sinónimos con las variaciones alélicas de las secuencias.

El término "complementario" significa que la presente invención abarca también secuencias nucleótidas que pueden hibridarse a las secuencias nucleótidas de la secuencia codificante.

El término "nucleótido" respecto a la presente invención incluye ADN genómico, cADN, ADN sintético y ARN. Preferentemente, significa ADN y más preferentemente cADN para la secuencia codificante de la presente invención.

El término "constructo" -que es sinónimo de términos tales como "conjugado", "cassette" e "híbrido",- incluye la secuencia nucleótida directa o indirectamente unida a un promotor. Un ejemplo de unión indirecta es la provisión de un grupo espaciador apropiado tal como la secuencia intrónica del intrón *Sh1* o del intrón ADH, entre el promotor y la secuencia nucleótida de la presente invención o el GOI. Lo mismo es aplicable para el término "fusionado", que incluye la unión directa o indirecta. En cada caso, los términos no abarcan la combinación natural del gen que codifica el enzima asociado habitualmente con el promotor del gen de tipo salvaje y cuando están ambos en su entorno natural.

El constructo puede incluso contener o expresar un marcador que permite la selección del constructo genético, en, por ejemplo, un hongo filamentosos, preferentemente del género *Aspergillus* tal como *Aspergillus niger*, o en plantas, tales como patatas, remolacha, etc..., a las que se ha transferido. Pueden utilizarse varios marcadores, tales como por ejemplo, los que codifican la manosa-6-fosfato isomerasa (especialmente para las plantas) o los que proporcionan la resistencia antibiótica, por ejemplo la resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina y gentamicina.

ES 2 163 644 T5

El término “vector” incluye los vectores de expresión y los de transformación.

El término “vector de expresión” significa un constructo capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

5 El término “vector de transformación” significa un constructo capaz de ser transferido de una especie a otra, - tal como desde un plásmido de *E. coli* a un hongo filamentoso, preferentemente del género *Aspergillus*. Puede incluso tratarse de un constructo capaz de ser transferido desde un plásmido de *E. coli* a un *Agrobacterium* a una planta.

10 El término “tejido” incluye tejido *per se* y órgano.

El término “organismo” como se describe en la presente memoria, incluye cualquier organismo que pueda incluir la secuencia nucleotídica que codifica el enzima recombinante, en el que un promotor, cuando se encuentra en el organismo, puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica.

15 Preferentemente, el organismo es un hongo filamentoso, preferentemente del género *Aspergillus*, más preferentemente *Aspergillus niger*.

20 El término “organismo transgénico” como se describe en la presente memoria, incluye cualquier organismo que comprenda la secuencia nucleotídica que codifica el enzima recombinante en el que el promotor puede permitir la expresión en el interior del organismo de la secuencia nucleotídica. Preferentemente, la secuencia nucleotídica se incorpora al genoma del organismo.

25 Preferentemente, el organismo transgénico es un hongo filamentoso, preferentemente del género *Aspergillus*, más preferentemente *Aspergillus niger*.

Por tanto, el organismo transgénico como se describe en la presente memoria incluye un organismo que comprende cualquier promotor, o las combinaciones del mismo, codificando la secuencia nucleotídica del enzima recombinante.

30 El término “organismo transgénico” no abarca la secuencia original nucleotídica codificante en su entorno natural, cuando se encuentra bajo el control de su promotor nativo que se encuentra también en su entorno natural.

La célula u organismo transformado podrían preparar cantidades aceptables del compuesto deseado que serían fácilmente recuperables a partir de ellos.

35 Preferentemente, el constructo como se ha descrito en la presente memoria comprende la secuencia nucleotídica como se ha descrito en la presente memoria y un promotor.

40 El término “promotor” se utiliza con el significado normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de unión a la ARN polimerasa en la teoría Jacob-Monod de la expresión génica.

45 En un aspecto, la secuencia nucleotídica se encuentra bajo el control de un promotor que puede tratarse de un promotor específico celular o tisular. Si, por ejemplo, el organismo es una planta, entonces el promotor puede ser tal que afecte a la expresión de la secuencia nucleotídica en alguno o algunos de los tejidos del tubérculo, tallo, brote, raíz y hoja.

50 Por ejemplo, el promotor para la secuencia nucleotídica, puede ser el promotor α -Amy 1 (conocido de otra forma como el promotor Amy 1, el promotor Amy 637 ó el promotor α -Amy 637) tal como se describe en nuestra solicitud de patente en trámite UK n° 9421292.5 presentada el 21 de octubre de 1994. Alternativamente, el promotor para la secuencia nucleotídica de la presente invención puede ser el promotor α -Amy 3 (conocido de otra forma como el promotor Amy 3, el promotor Amy 351 o el promotor α -Amy 351) tal como se describe en nuestra solicitud de patente en trámite UK n° 9421286.7 presentada el 21 de octubre de 1994.

55 El promotor podría además incluir características para asegurar o aumentar la expresión en un huésped apropiado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas tales como una secuencia Pribnow o TATA. El promotor puede incluso contener otras secuencias que afecten (mantengan, potencien o disminuyan) los niveles de expresión de la secuencia nucleotídica. Por ejemplo, otras secuencias apropiadas incluyen la intron *Sh1* o un intron ADH. Otras secuencias incluyen elementos capaces de ser inducidos, tales como elementos de temperatura, químicos, luminosos o de éxtasis. Asimismo, pueden encontrarse elementos apropiados para potenciar la transcripción o la traducción. Un ejemplo del último elemento es la secuencia señal TMV 5' (véase Sleat Gene 217 [1987] 217-225; y Dawson Plant Mol. Biol. 23 [1993] 97).

60 Además, la presente invención puede utilizar combinaciones de promotores y/o secuencias nucleotídicas que codifican proteínas o enzimas y/o elementos recombinantes.

65 Se describe asimismo en la presente memoria la utilización de promotores para expresar una secuencia nucleotídica que codifica el enzima recombinante, en la que una parte del promotor está inactivada pero éste todavía puede funcionar como tal. La inactivación parcial de un promotor, en algunos casos, es ventajosa. En particular, con el promotor Amy

351 mencionado anteriormente es posible inactivar una parte de él de forma que el promotor parcialmente inactivado exprese el nucleótido de una forma más específica, tal como justamente en un órgano o tipo tisular específico.

5 El término “inactivado” significa la inactivación parcial en el sentido de que el patrón de expresión del promotor se modifica, pero en el que el promotor parcialmente inactivado funciona todavía como tal. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, el promotor modificado es capaz de expresar el nucleótido de la presente invención o una GOI en por lo menos un tejido específico (pero no en todos) del promotor original. Uno de tales promotores es el promotor Amy 351 anteriormente descrito. Ejemplos de inactivación parcial incluyen la alteración del patrón de plegamiento de la secuencia del promotor, o el tipo de unión a partes de la secuencia nucleótida, de forma que una parte de ésta no es reconocida, por ejemplo, por la ARN polimerasa. Otra manera, preferible, de inactivar parcialmente al promotor es truncarlo para fragmentarlo. Otra manera sería provocar la mutación de por lo menos una parte de la secuencia, de forma que la ARN polimerasa no se pudiera unir a aquella parte o a esta otra. Otra modificación es provocar la mutación de los sitios de unión de las proteínas reguladoras, por ejemplo de la proteína CreA, conocida porque en los hongos filamentosos lleva a cabo la represión de los catabolitos del carbono, y abolir de este modo la represión de los catabolitos del promotor nativo.

15 El organismo huésped puede ser un organismo eucariótico o procariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos apropiados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las enseñanzas respecto a la transformación de los huéspedes procarióticos están bien documentadas en la técnica, por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se utiliza un huésped procariótico, el gen puede requerir entonces ser modificado apropiadamente antes de la transformación, tal como mediante la eliminación de los intrones.

20 Como se ha expuesto anteriormente, un organismo huésped preferido pertenece al género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Un *Aspergillus* transgénico según la presente invención, puede prepararse siguiendo las enseñanzas de Rambossek, J. y Leach, J. 1987 (Recombinant DNA in filamentous fungi: Progress and Prospects. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 6: 357-393), Davis R.W. 1994 (Heterologous gene expression and protein secretion in *Aspergillus*. En: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (Editores) *Aspergillus: 50 years on*. Progress in industrial microbiology vol. 29, Elsevier Amsterdam, 1994, pp. 525-560), Ballance, D.J. 1991 (Transformation systems for Filamentous Fungi and an Overview of Fungal Gene structure. En: Leong, S.A., Berka R.M. (editores) Molecular Industrial Mycology. Systems and Applications for Filamentous Fungi. Marcel Dekker Inc. New York 1991, pp. 1-29) y Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation. En : Martinelli S.D. Kinghorn J.R. (editores). *Aspergillus: 50 years on*. Progress in industrial microbiology vol. 29, Elsevier Amsterdam, 1994, pp. 641-666). Sin embargo, el siguiente comentario proporciona un resumen de estas enseñanzas para la producción transgénica de *Aspergillus* según la presente invención.

30 Durante casi un siglo, los hongos filamentosos se han venido utilizando ampliamente en muchos tipos de industria para la producción de compuestos orgánicos y enzimas. Por ejemplo, el koji japonés tradicional y las fermentaciones de la soja han utilizado *Aspergillus sp.* Del mismo modo, en este siglo se ha utilizado *Aspergillus niger* para la producción de ácidos orgánicos, en particular ácido cítrico y la producción de varios enzimas para uso en la industria.

45 Existen dos razones importantes para determinar la razón por la cual los hongos filamentosos se han utilizado tan ampliamente en la industria. En primer lugar, los hongos filamentosos pueden producir grandes cantidades de productos extracelulares, por ejemplo, enzimas y compuestos orgánicos tales como antibióticos o ácidos orgánicos. En segundo lugar, los hongos filamentosos pueden desarrollarse sobre sustratos que poseen un coste bajo, tales como semillas, salvado, remolacha, pulpa, etc. Las mismas razones han hecho que los hongos filamentosos sean organismos atractivos como huéspedes para la expresión heteróloga, según la presente invención.

50 Con objeto de preparar el *Aspergillus* transgénico, se preparan los constructos de expresión insertando la secuencia nucleótida según la presente invención (o incluso el GOI) en un constructo diseñado para la expresión en los hongos filamentosos.

55 Se han desarrollado varios tipos de constructos utilizados para la expresión heteróloga. Estos constructos contienen preferentemente un promotor que es activo en los hongos. Ejemplos de promotores incluyen un promotor fúngico para un enzima extracelular que se expresa intensamente, tal como el promotor de la glucoamilasa o el promotor de la α -amilasa. La secuencia nucleótida según la presente invención (o incluso el GOI) pueden fusionarse a una secuencia señal que dirige la secreción de la proteína codificada por la secuencia nucleótida según la presente invención (o incluso el GOI). Habitualmente, se utiliza una secuencia señal de origen fúngico. Un finalizador activo en los hongos clausura el sistema de expresión.

60 En los hongos en los que la secuencia nucleótida puede fusionarse a una parte más pequeña o más grande de un gen fúngico que codifica una proteína estable, se ha desarrollado otro tipo de sistema de expresión. Esta proteína estable puede estabilizar la proteína codificada por la secuencia nucleótida. En tal sistema, puede introducirse entre la proteína fúngica y la codificada por la secuencia nucleótida un sitio de fragmentación, reconocido por una proteasa específica, de forma que la proteína de fusión producida pueda fragmentarse en esta posición mediante la proteasa específica, liberando de este modo la proteína codificada por la secuencia nucleótida. Como ejemplo, se puede introducir un sitio que es reconocido por una peptidasa de tipo KEX-2 encontrada en al menos algunos *Aspergilli*. Tal fusión conduce a

ES 2 163 644 T5

una fragmentación *in vivo*, dando lugar a una protección del producto expresado y no a una proteína de fusión más grande.

Se ha informado de la expresión heteróloga en *Aspergillus* para varios genes que codifican proteínas bacterianas, fúngicas, de vertebrados y vegetales. Las proteínas pueden depositarse intracelularmente si la secuencia nucleótida no se fusiona a una secuencia señal. Tales proteínas se acumularán en el citoplasma y habitualmente no estarán glicosiladas, lo cual puede constituir una ventaja para algunas proteínas bacterianas. Si la secuencia nucleótida está equipada con una secuencia señal, la proteína se acumulará extracelularmente.

Con respecto a la estabilidad del producto y a las modificaciones de la cepa huésped, algunas proteínas heterólogas no son muy estables cuando son secretadas en el líquido del cultivo de los hongos. La mayoría de los hongos producen varias proteasas extracelulares que degradan a las proteínas heterólogas. Para evitar este problema, se han utilizado cepas fúngicas especiales con producción proteásica reducida como huésped para la producción heteróloga.

Para la transformación de los hongos filamentosos, se han desarrollado diversos protocolos de transformación para muchos de ellos (Ballance 1991, *ibid*). Muchos de estos protocolos están basados en la preparación de protoplastos y la introducción del ADN en ellos, utilizando PEG e iones Ca^{2+} . Los protoplastos transformados se regeneran entonces y los hongos transformados se seleccionan utilizando varios marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación, existen diversos marcadores auxotróficos tales como *argB*, *trpC*, *niaD* y *pyrG*, marcadores de la resistencia antibiótica tales como la resistencia al benomil, a la higromicina y a la fleomicina. Un marcador de transformación utilizado habitualmente es el gen *amdS* de *A. nidulans*, que con un elevado número de copias, permite al hongo desarrollarse con acrilamida como única fuente de nitrógeno.

En otra forma de realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras se han utilizado también ampliamente como un vehículo para la expresión génica heteróloga. La especie *Saccharomyces cerevisiae* posee una larga historia de utilización industrial, incluyendo su empleo para la expresión génica heteróloga. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey *et al.* (1987, Yeast Biotechnology, D. R. Berry *et al.* editores, pp. 401-429, Allen y Unwin, London) y por King *et al.* (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E. F. Walton and G. T. Yarronton, eds, pp. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones *Saccharomyces cerevisiae* se adapta bien para la expresión génica heteróloga. En primer lugar, no es patógena para el hombre y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, posee una larga historia de utilización segura después de siglos de explotación comercial con distintas finalidades. Esto ha conducido a una aceptabilidad pública amplia. En tercer lugar, la utilización comercial extensa y la investigación que se ha dedicado al organismo, ha producido un abundante conocimiento de su genética y fisiología, así como de las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

En E. Hinchcliffe E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol. 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, ed, 2ª edición, Academic Press Ltd.), se proporciona una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y de la secreción de los productos génicos.

Están disponibles diversos tipos de vectores de levaduras, incluyendo vectores integradores, que necesitan recombinación con el genoma huésped para su mantenimiento, y vectores plasmídicos autónomamente replicantes.

Con objeto de preparar la *Saccharomyces* transgénica, se preparan constructos de expresión insertando la secuencia nucleótida en un constructo diseñado para la expresión en las levaduras. Se han desarrollado varios tipos de constructos que se utilizan para la expresión heteróloga. Los constructos contienen un promotor activo en la levadura fusionado a la secuencia nucleótida, utilizándose habitualmente un promotor de origen en la levadura, tal como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una señal de secuencia de origen en la levadura, tal como la secuencia que codifica la señal peptídica SUC2. Un finalizador activo en la levadura completa el sistema de expresión.

Para la transformación de la levadura, se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, una *Saccharomyces* transgénica, puede prepararse siguiendo las enseñanzas de Hinnen *et al.* (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J.D. (1978, Nature, London, 275, 104); e Ito, H *et al.* (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Las células transformadas de levadura son seleccionadas utilizando varios marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existen diversos marcadores auxotróficos tales como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores dominantes de la resistencia antibiótica tales como los marcadores antibióticos aminoglicósidos, por ejemplo, el G418.

Otro organismo huésped es una planta.

Aunque el enzima y la secuencia nucleótida codificante no se dan a conocer en los documentos EP-B-0470145 y CA-A-2006454, estos dos documentos proporcionan algún comentario útil anterior respecto a los tipos de técnicas que pueden utilizarse para preparar plantas transgénicas según la presente invención. Algunas de estas enseñanzas anteriores se incluyen ahora en el siguiente comentario.

ES 2 163 644 T5

El principio básico en la construcción de plantas modificadas genéticamente es insertar información genética en el genoma del vegetal de forma que se obtenga una conservación estable del material genético insertado.

Existen varias técnicas para insertar la información genética, siendo los dos principios importantes la introducción directa de la información genética utilizando un sistema vectorial. Una revisión de las técnicas generales puede encontrarse en artículos de Potrykus (Annu Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech, marzo/abril 1994, 17-27).

El sistema vectorial puede comprender un vector, pero puede comprender dos. En éste caso, se alude al sistema vectorial como un sistema vector binario. Los sistemas vectores binarios están descritos con más detalle en Gynheung *et al.* (1980), Binary Vectors, *Plant Molecular Biology Manual* A3, 1-19.

Un sistema utilizado ampliamente para la transformación de las células vegetales con un promotor, secuencia nucleótida, o constructo dados, se basa en la utilización de un plásmido Ti procedente de *Agrobacterium tumefaciens* o un plásmido Ri procedente de *Agrobacterium rhizogenes* An *et al.* (1986), *Plant Physiol.*, 81, 301-305 y Butcher D.N. *et al.* (1980), *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, ed.: D.S. Ingrams y J.P. Helgeson, 203-208.

Se han construido varios distintos plásmidos Ti y Ri que son apropiados para la construcción de los constructos celulares de las plantas que se describen anteriormente. Un ejemplo no limitativo de tal plásmido Ti es pGV3850.

La secuencia nucleótida o el constructo como se ha descrito en la presente memoria se insertará preferentemente en el plásmido Ti entre las secuencias terminales del T-ADN o adyacente a una secuencia de T-ADN, de forma que se evite la interrupción de las secuencias que rodean inmediatamente a los límites del T-ADN, ya que por lo menos una de estas regiones parece ser esencial para la inserción del T-ADN modificado en el genoma de la planta.

Tal como se comprenderá a partir de la explicación anterior, si el organismo es una planta, entonces el sistema vector será preferentemente el que contenga las secuencias necesarias para infectar la planta (por ejemplo, la región *vir*) y al menos una parte del límite de una secuencia del T-ADN, localizándose esta parte del límite en el mismo vector que el constructo genético. Preferentemente, el sistema vectorial es un plásmido Ti procedente de *Agrobacterium tumefaciens* o un plásmido Ri procedente de *Agrobacterium rhizogenes* o un derivado del mismo, pues estos plásmidos son bien conocidos y utilizados ampliamente en la construcción de plantas transgénicas, existiendo muchos sistemas vectoriales que se basan en estos plásmidos o en sus derivados.

En la construcción de una planta transgénica, la secuencia nucleótida o constructo puede crearse en primer lugar en un microorganismo en el que el vector pueda replicarse y en el que sea fácil de manipular antes de la inserción en la planta. Un ejemplo de un microorganismo útil es *E. coli*, pero pueden utilizarse otros microorganismos que presentan las propiedades anteriores. Cuando un vector de un sistema vectorial tal como el anteriormente definido se ha creado en *E. coli*, es transferido, si es necesario, a una cepa apropiada de *Agrobacterium*, por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido Ti que alberga a la secuencia nucleótida o constructo, se transfiere preferentemente de este modo a una cepa de *Agrobacterium* apropiada, por ejemplo, *A. tumefaciens*, de forma que se obtenga una célula de *Agrobacterium* que albergue la secuencia nucleótida o constructo, cuyo ADN se transfiere subsiguientemente a la célula vegetal que va a modificarse.

Tal como se informó en el documento CA-A-2006454, están disponibles una gran cantidad de vectores de clonación que contienen un sistema de replicación en *E. coli* y un marcador que permite una selección de las células transformadas. Los vectores contienen por ejemplo pBR 322, la serie pUC, la serie M13 mp, pACYC 184, etc.

De esta forma, el nucleótido o constructo puede introducirse en el vector en una posición de restricción adecuada. El plásmido contenido se utiliza para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* se cultivan en un medio nutriente apropiado y se recuperan entonces, lisándose. A continuación, se recupera al plásmido. Como procedimiento analítico se utiliza generalmente el análisis secuencial, el análisis de restricción, la electroforesis y otros procedimientos de bioquímica-biología molecular. Después de cada manipulación, la secuencia ADN utilizada puede ser sometida a restricción y conectada con la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia puede clonarse en el mismo o en distinto plásmido.

Después de cada procedimiento de introducción en las plantas del promotor, constructo o secuencia nucleótida deseados, según la presente invención, puede ser necesaria la presencia y/o inserción de otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, para la transformación de las plantas se utiliza el plásmido Ti ó Ri, pueden conectarse al menos el límite derecho -y a menudo sin embargo-, el derecho y el izquierdo del T-ADN plasmídico Ti y Ri, como áreas que flanqueen a los genes que se han introducido. La utilización del T-ADN para la transformación de las células vegetales se ha estudiado extensamente y se describe en el documento EP-A-120516; Hoekema, en: *The Binary Plant Vector System* Offset-drukkerij Kanters B.B., Alblasterdam, 1985, capítulo V; Fraley *et al.*, *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 4:1-46; y An *et al.*, *EMBO J.* (1985) 4:277-284.

La infección directa de los tejidos vegetales por *Agrobacterium* es una técnica sencilla que se ha utilizado ampliamente y que se describe en Butcher D.N. *et al.* (1980), *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, editores: D.S. Ingrams y J.P. Helgeson, 203-208. Para más enseñanzas sobre el particular, véase Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech marzo/abril 1994, 17-27). Con esta téc-

ES 2 163 644 T5

nica, la infección de una planta puede realizarse en cierta región o tejido del vegetal, es decir, en una región de una hoja, una raíz, un tallo u otra parte de la planta.

5 Típicamente, la infección directa de los tejidos de la planta mediante *Agrobacterium* que transporta el promotor y/o la GOI, tiene lugar produciendo una lesión a la planta que debe ser infectada, por ejemplo, mediante una hoja de afeitar o pinchando con una aguja, o frotando la planta con un abrasivo. La lesión se inocula entonces con el *Agrobacterium*. El vegetal inoculado o una parte del mismo se dispone entonces en un medio de cultivo apropiado y se deja que se desarrolle a plantas maduras.

10 Cuando se crean las células vegetales, estas células pueden desarrollarse y conservarse de acuerdo con los procedimientos bien conocidos de cultivo tisular, tales como cultivando las células en un medio de cultivo apropiado al que se han suministrado los factores de crecimiento necesarios tales como aminoácidos, hormonas vegetales, vitaminas, etc. La regeneración de las células transformadas en las plantas modificadas genéticamente puede llevarse a cabo utilizando procedimientos conocidos para la regeneración de plantas a partir de las células o de los cultivos tisulares, por ejemplo, seleccionando brotes transformados utilizando un antibiótico y subcultivando los brotes en un medio que contenga nutrientes apropiados, hormonas vegetales, etc.

Otras enseñanzas sobre la transformación de plantas, pueden encontrarse en el documento EP-A-0449375.

20 En resumen, la presente invención proporciona un procedimiento para estabilizar por lo menos una proteína en un entorno ácido que comprende ponerla en contacto con una pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, en particular una pectina desesterificada enzimáticamente en bloque preparada mediante técnicas del ADN recombinante.

25 Una forma de realización preferida de la presente invención se refiere a un procedimiento para estabilizar por lo menos una proteína en un entorno ácido, que comprende poner en contacto la proteína con una pectina desesterificada enzimáticamente en bloque preparada mediante técnicas del ADN recombinante, en el que la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque se prepara utilizando un enzima recombinante, y en el que el enzima recombinante comprende cualquiera de las secuencias aminoácidas que se muestran como SEC ID n° 1 ó SEC ID n° 2 o que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 75% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas como SEC ID n° 1 o SEC ID n° 2, y que presenta las siguientes características:

1. Un peso molecular de entre 36 kD y 64 kD aproximadamente;
2. Un pH óptimo de 7-8 medido con pectina lima al 0,5% en 0,15 M NaCl;
- 35 3. Una temperatura óptima de al menos 50°C;
4. Una estabilidad térmica comprendida de entre 10°C y por lo menos 40°C;
- 40 5. Un valor K_m de 0,07%;
6. Un máximo de actividad a niveles de 0,25 M NaCl aproximadamente;
7. Un máximo de actividad a niveles de 0,2 M Na_2SO_4 aproximadamente; y
- 45 8. Un máximo de actividad a niveles de 0,3 M NaNO_3 aproximadamente.

Se da a conocer en la presente memoria un procedimiento para desesterificar enzimáticamente en bloque una pectina, que comprende el tratamiento de ésta con un enzima recombinante que comprende cualquiera de las secuencias aminoácidas que se muestran como SEC ID n° 1 ó SEC ID n° 2, o que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 75% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas como SEC ID n° 1 o SEC ID n° 2, en el que el enzima recombinante presenta las siguientes características:

- 55 1. Un peso molecular comprendiendo entre 36 kD y 64 kD aproximadamente;
2. Un pH óptimo de 7-8 medido con pectina lima al 0,5% en 0,15 M NaCl;
3. Una temperatura óptima de por lo menos 50°C;
- 60 4. Una estabilidad térmica comprendida entre 10°C y por lo menos 40°C;
5. Un valor K_m de 0,07%;
6. Un máximo de actividad a niveles de 0,25 M NaCl aproximadamente;
- 65 7. Un máximo de actividad a niveles de 0,2 M Na_2SO_4 aproximadamente; y
8. Un máximo de actividad a niveles de 0,3 M NaNO_3 aproximadamente.

ES 2 163 644 T5

Se da a conocer en la presente memoria un enzima recombinante que comprende cualquiera de las secuencias aminoácidas que se muestran como SEC ID n° 1 ó SEC ID n° 2, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 75% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas como SEC ID n° 1 o SEC ID n° 2, en el que el enzima recombinante presenta las siguientes características:

1. Un peso molecular comprendido entre 36 kD y 64 kD aproximadamente;
2. Un pH óptimo de 7-8 medido con pectina lima al 0,5% en 0,15 M NaCl;
3. Una temperatura óptima de por lo menos 50°C;
4. Una estabilidad térmica comprendida entre 10°C y por lo menos 40°C;
5. Un valor K_m de 0,07%;
6. Un máximo de actividad a niveles de 0,25 M NaCl aproximadamente;
7. Un máximo de actividad a niveles de 0,2 M Na_2SO_4 aproximadamente; y
8. Un máximo de actividad a niveles de 0,3 M NaNO_3 aproximadamente.

Otras formas de realización preferidas de la presente invención se refieren al procedimiento preferido anteriormente mencionado y en las que el enzima recombinante se ha expresado mediante una secuencia nucleótida que comprende la secuencia que se muestra como SEC ID n° 3 ó SEC ID n° 4, o una variante, derivada u homóloga de la misma.

La muestra siguiente se ha depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest en el depositario reconocido The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) en 23 St. Machar Drive, Aberdeen, Escocia, AB2 1RY, Reino Unido, el 6 de julio de 1995: NCIMB 40749 (que corresponde al plásmido pO34).

La muestra siguiente se ha depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest en el depositario reconocido The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) en 23 St. Machar Drive, Aberdeen, Escocia, AB2 1RY, Reino Unido, el 12 de julio: NCIMB 40750 (que corresponde al plásmido pO17).

Por tanto, las formas de realización más preferidas de la presente invención se refieren al procedimiento anteriormente mencionado y en las que el enzima recombinante es capaz de expresarse mediante NCIMB 40749 ó NCIMB 40750.

La secuencia aminoácida que comprende la secuencia que se muestra como SEC ID n° 5, resulta apropiada para utilizarla con el fin de proporcionar o aumentar la estabilidad térmica a una proteína.

Además, la secuencia nucleótida que comprende la secuencia que se muestra como SEC ID n° 6, resulta apropiada para utilizarla en la expresión de una secuencia aminoácida para proporcionar o aumentar la estabilidad térmica a una proteína.

Con relación a estos últimos aspectos, es igualmente aplicable el comentario anterior respecto a las variantes, derivadas, homólogos, constructos, vectores y a la transformación de organismos huéspedes, aunque por supuesto que en este caso la secuencia aminoácida y la nucleótida afectan a la estabilidad de las proteínas.

A este respecto, se cree que la secuencia aminoácida que se muestra como SEC ID n° 5 es capaz de proporcionar o aumentar la estabilidad térmica de una proteína, tal como la PME recombinante para su utilización en la presente invención. La secuencia aminoácida puede también aumentar o proporcionar estabilidad térmica a otras proteínas, incluyendo las PMEs de otras fuentes.

A continuación se describe la presente invención, únicamente a título de ejemplo, haciendo referencia a las siguientes Figuras adjuntas:

La Figura 1, que es un diagrama esquemático de un fruto cítrico, tal como una naranja;

La Figura 2, que es un gel SDS-PAGE del enzima recombinante de la presente invención;

La Figura 3, que es un gráfico para determinar el pH óptimo;

La Figura 4, que es un gráfico para determinar la temperatura óptima;

La Figura 5, que es un gráfico para determinar la estabilidad de la temperatura;

La Figura 6, que es un gráfico para determinar el valor K_m ;

ES 2 163 644 T5

La Figura 7, que es un gráfico para determinar la actividad en presencia o ausencia de NaCl;

La Figura 8, que es un gráfico para determinar la actividad en presencia o ausencia de Na₂SO₄;

5 La Figura 9, que es un gráfico para determinar la actividad en presencia o ausencia de NaNO₃;

La Figura 10, que es un mapa plasmídico del pO17;

La Figura 11, que es un mapa plasmídico del pO34;

10 La Figura 12, que es una representación diagramática de dos genes;

La Figura 13, que es un mapa plasmídico del pJK10;

15 La Figura 14, que es un mapa plasmídico del pJK11;

La Figura 15, que es un mapa plasmídico del pJK12;

La Figura 16, que es un mapa plasmídico del pJK20;

20 La Figura 17, que es un mapa plasmídico del pJK21; y

La Figura 18, que es un mapa plasmídico del pJK22;

25 En la descripción anterior ya se ha hecho referencia a la Figura 1. Las otras Figuras se consideran en el comentario que sigue.

Sección experimental

30 *Materiales y procedimientos para bioquímica*

Material de la planta: Para el aislamiento de la PME, se utilizaron naranjas españolas inmaduras del tipo I de la variedad *Navelina* sin semillas. Las naranjas se pelaron manualmente y las pieles se conservaron a -80°C.

35 *Extracción de PME de las pieles de las naranjas*

Se purificó la PME según el procedimiento siguiente. Todas las operaciones se realizaron a 4°C. 600 g de pieles de naranja congeladas se descongelaron y se cortaron en piezas más pequeñas. Se homogenizaron entonces en un mezclador Warring durante 2 minutos en un tampón de 1200 ml (100 mM succinato sódico, pH 6,2, 1 mM DTT). Se añadieron 36 g de NaCl sólido al homogenizado para alcanzar una concentración final del 3% (peso/vol) con objeto de aislar las proteínas unidas a la membrana (Versteeg *et al.* (1978) *Lebensmittel.- Wiss. u. Technol.*, 11:267-274). Después de 2 horas de incubación con agitación suave a 4°C, la suspensión se filtró a través de una red de nylon, centrifugándose el filtrado a 10.000 rpm durante 20 minutos para eliminar los residuos insolubles.

45 El sobrenadante se fraccionó entonces utilizando precipitación mediante (NH₄)₂ SO₄. El sobrenadante se precipitó en primer lugar con (NH₄)₂SO₄ al 30% bajo agitación lenta durante 30 minutos. Después de centrifugación a 20.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se precipitó ulteriormente con (NH₄)₂SO₄ al 60% durante 30 minutos. La suspensión se centrifugó como anteriormente y el precipitado se volvió a suspender en 50 ml de 50 mM MES, 1 mM DTT pH 6,8 y se dializó contra el mismo tampón durante la noche.

50 *Cromatografía*

La muestra dializada se separó ulteriormente mediante cromatografía de intercambio catiónico. Una muestra de 40-50 ml se aplicó a una columna CM-Sepharose™ CL-6B (1,5 x 15 cm) en dos sesiones, con un lavado de 30 minutos entre éstas con el tampón A: 50 mM MES, 1 mM DTT, pH 6,8. Después del lavado de las proteínas no unidas con el tampón A, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente creciente de NaCl a partir de 0-0,4 M NaCl en 500 ml 55 totales. El flujo fue de 25 ml/h y se recuperaron las fracciones de 8,33 ml. El perfil de absorción de las proteínas se midió a 280 nm.

60 Todas las fracciones se analizaron respecto a la actividad PME y las proteínas. El contenido proteico se midió espectrofotométricamente con el procedimiento de BioRad.

Las fracciones que contenían actividad PME se unieron y se concentraron mediante diálisis a presión utilizando el sistema de filtro Amicon. El intercambio del tampón a 50 mM Tris, 1 mM DTT, 0,1 M NaCl pH 7, se realizó en el mismo sistema.

65 9 ml de la muestra concentrada de PME se aplicaron entonces a una columna de filtración en gel Sephacryl™ S-200 (2,6 x 70 cm). La columna se equilibró con 50 mM Tris, 1 mM DTT, 0,1 M NaCl pH 7. El flujo fue de 40 ml/h, recuperándose fracciones de 5,33 ml. Las fracciones que contenían actividad PME se unieron y concentraron.

ES 2 163 644 T5

Actividad enzimática

La PME cataliza la fragmentación de grupos metiléster a partir de la pectina. Durante las etapas de purificación, se detectó PME mediante un procedimiento rápido utilizando el ensayo del indicador rojo de metilo. Debido a la fragmentación de los grupos metilo a partir de los residuos de ácido galacturónico en la cadena pectínica, se formaron grupos carboxílicos y el pH disminuyó en el ensayo. Cuando disminuyó el pH, se produjeron cambios de coloración del indicador rojo de metilo desde amarillo (pH 6,2) a rosa (pH 4,2). El ensayo contenía 1 ml de Grindsted™ pectina 1450 al 0,5% (DE 70%) (suministrada por Danisco Ingredients, Danisco A/S) solubilizada en 0,15 M NaCl pH 7 y una muestra de 125 μ l. Las muestras que dieron positivo al ensayo del rojo de metilo después de 10 minutos de incubación a 30°C, se evaluaron ulteriormente mediante el procedimiento de titulación (Versteeg *et al.* (1978) *Lebensmittel.- Wiss. u. Technol.*, 11:267-274).

Con el método de titulación el ensayo contenía 10 ml de pectina lima al 0,5% (Grindsted™ pectina 1450 suministrada por Danisco Ingredients, Danisco A/S) solubilizada en 0,15 M NaCl pH 6,8 y una muestra de 10-100 μ l. La titulación se llevó a cabo con 0,02 M NaOH y la reacción se midió a la temperatura ambiente. se utilizó un titulador automático (Versteeg *et al.* (1978) *Lebensmittel.- Wiss. u. Technol.*, 11:267-274).

SDS-PAGE/Transferencia Western

La pureza de la fracción PME se investigó mediante SDS-PAGE utilizando el PhastSystem™ de Pharmacia con geles de gradiente SDS de entre el 10 y el 15%. La electroforesis y la tinción argéntica de las proteínas se llevaron a cabo tal como se describe en los manuales de Pharmacia. Para la determinación de pI IEF 3-9, se utilizaron geles de PhastSystem™.

La inmunoelectroforesis se utilizó para la caracterización de los anticuerpos policlonales producidos contra la PME de las peladuras de naranja. Las fracciones enzimáticas se separaron sobre SDS-PAGE y se transfirieron a papel NC mediante la técnica de transferencia semi-seca sobre una unidad de transferencia Semidry del PhastSystem™. El papel NC se incubó con el anticuerpo iniciador diluido 1:50 y teñido con el segundo anticuerpo unido a la fosfatasa alcalina (Dako A/S Glsotrup, Dinamarca) utilizada en una dilución del 1:1000.

Elaboración de los mapas peptídicos

La PME se digirió con tripsina o endo-proteinasa Lys-C obtenida de *Lysobacter enzymogenes* (ambas preparaciones enzimáticas mostraban un grado de secuenciación y se obtuvieron de Boehringer Mannheim, Alemania).

100 μ g de PME purificada se metiló en los grupos carboxilo con yodoacetamida para proteger los grupos SH reducidos. A continuación, la proteína se fragmentó con tripsina (4 μ g/20-100 μ l). La fragmentación hidrolítica se realizó a 40°C durante 2 x 3 horas. La reacción se detuvo añadiendo 20 μ l de TFA. Después de centrifugación a 15.000 rpm durante 5 minutos, los péptidos se purificaron en una columna HPLC de fase inversa (columna Vydac 10 C18). Se aplicaron muestras de 2 x 500 μ l. Se eluyeron los péptidos y se separaron con un gradiente de acetonitrilo que se incrementaba desde 0,05% a 0,35% en 60 minutos en TFA al 0,1%. Los péptidos se recuperaron manualmente en tubos de Eppendorf.

Para la digestión con endo-proteinasa Lys-C, se disolvió la PME liofilizada (0,1 mg) en 50 μ l de 8 M urea, 0,4 M NH_4HCO_3 , pH 8,4. Después de cubrir con N_2 y añadir 5 μ l de 45 mM DTT, la proteína se desnaturalizó y se redujo durante 15 min. a 50°C bajo N_2 . Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se añadieron 5 μ l de 100 mM yodoacetamida durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad bajo N_2 para que se derivatizaran las cisteínas. Subsiguientemente, se añadieron 90 μ l de agua y 5 μ g de endo-proteinasa Lys-C en 50 μ l de 50 mM tricina y 10 mM EDTA, pH 8,0, llevándose a cabo la digestión durante 24 horas a 37°C bajo N_2 .

Los péptidos resultantes se separaron tal como se describe para los péptidos digeridos por la tripsina.

Los péptidos seleccionados se purificaron posteriormente en una columna RP-HPLC 3 C₁₈ de Devosil, de 0,46 x 10 cm (Novo Nordisk, Dinamarca). Los péptidos purificados se aplicaron entonces a un secuenciador de aminoácidos, Applied Biosystems 476A, que utiliza ciclos rápidos de líquido pulsado.

Estudio 1

Durante la purificación de PME, 600 g de peladuras de naranja congeladas se homogenizaron y después de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30-60% y diálisis, la muestra se aplicó a una columna de intercambio catiónico (CM-Sepharose™ CL-6B). La PME se une intensamente al material de la columna de intercambio catiónico, a un pH de 6,8, mientras que la mayoría de las proteínas no se unen a la columna y por tanto, eluyen en el volumen de lavado. Con el aumento del gradiente de NaCl, la PME eluyó en dos picos con la actividad mayor en la PME I (fracción 49-53) a una concentración de NaCl de 0,25 M. Un pico PME más pequeño eluyó a una concentración más baja de NaCl (fracción 25-32). La purificación ulterior sólo se llevó a cabo para la PME I, que contenía la actividad mayor.

ES 2 163 644 T5

Después de concentración, la fracción PME se purificó ulteriormente utilizando la cromatografía de filtración en gel (columna S-200 de Sephacryl™). Las fracciones que contenían la actividad PME más alta se unieron y se concentraron sobre filtros Amicon para diálisis.

5 En total, se obtuvieron aproximadamente 4 mg de PME a partir de 600 g de peladuras de naranja que corresponde a un rendimiento proteico del 12%.

SDS-PAGE mostró sólo una banda proteica en la fracción PME purificada, con un peso molecular de 36.000 D (Figura 2). El enfoque isoeléctrico de PME mostró que el pI fue > 9.

10 *Caracterización y datos cinéticos*

La caracterización de PME y las determinaciones óptimas se realizaron todas con el método de titulación tal como se describe en Materiales y Métodos.

15 El pH óptimo de la actividad PME se midió con la pectina lima al 0,5% (Grindsted™ Pectin 1450 suministrada por Danisco Ingredients, Danisco A/S) solubilizada en 0,15 M NaCl. Los datos se muestran en la Figura 3. El óptimo se encontró a un pH de aproximadamente 7-8.

20 El óptimo de temperatura se encontró a 50°C, (véanse los datos mostrados en la Figura 4).

La estabilidad térmica (temperatura) de PME se determinó incubando la muestra enzimática en tubos de Eppendorf a distintas temperaturas durante 15 minutos. Después de incubación, se midió la actividad enzimática mediante el ensayo tradicional del procedimiento de titulación. La estabilidad de la actividad enzimática estaba entre 10 y 40°C (véanse los datos de la Figura 5).

La afinidad por la pectina lima al 0,5% (Grindsted™ Pectin 1450 suministrada por Danisco Ingredients, Danisco A/S), se determinó mediante la graficación Lineweaver Burk de distintas concentraciones de pectina, respecto a la actividad. Los datos se muestran en la Figura 6. La K_m que se calculó a partir de la curva fue de 0,07%.

30 También se encontró que la PME podría desesterificar asimismo la pectina de la remolacha azucarera. La pectina de ésta contiene un 60% de residuos de ácido galacturónico, algunos de cuyos grupos carboxilos están metilados (un DE aproximado del 60%) y, además, algunos de los grupos del ácido galacturónico están acetilados en C-2 y/o C-3. La actividad PME se midió tal como se describe en Materiales y Métodos, excepto en que se utilizó en el ensayo el 1% de la pectina de la remolacha azucarera solubilizada en 0,15 M NaCl, pues la pectina de la remolacha azucarera contenía aproximadamente el 60% de la pectina. Los resultados mostraron que la PME podría desesterificar la pectina de la remolacha azucarera, incluso aunque los residuos de ácido galacturónico estén acetilados en las posiciones C-2/C-3.

	Actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$)
Pectina de lima al 0,5% (Grindsted™ Pectin 1450 suministrada por Danisco Ingredients, Danisco A/S)	387
Pectina de remolacha azucarera al 1,0%	80

50 Experimentos posteriores mostraron que la PME de la presente invención necesita preferentemente NaCl para su actividad (véanse los datos de la Figura 7). La actividad aumenta con el incremento de la concentración de NaCl, con un óptimo a 0,25 M NaCl. Las concentraciones más altas reducen la actividad, comparadas con la actividad máxima.

55 Experimentos posteriores mostraron que otras sales, por ejemplo Na_2SO_4 ó NaNO_3 pueden sustituir a NaCl en cuanto a la actividad PME. Los datos se muestran en las Figuras 8 y 9. La actividad óptima se encontró en Na_2SO_4 0,2 M ó NaNO_3 0,3 M, respectivamente.

Análisis N-terminal

60 Estudios mostraron que la secuencia N-terminal de la PME nativa estaba bloqueada. El desbloqueo se alcanzó tratando la PME transferida sobre una membrana PVDF con TFA anhidro durante 4 minutos a 45°C en tubos de ensayo. Después de la evaporación de la mayoría del TFA, los tubos se situaron a 65°C durante 4 horas (Wellner, D. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:1947-1949). La secuencia obtenida fue SSSVTPNVVVAADSSGNFK y la n-acetilserina es el residuo N-terminal de PME.

65

ES 2 163 644 T5

Localización inmuno histo química

Para la preparación de muestras tisulares para inmuno histo química, rodajas delgadas de la parte media del fruto maduro se fijaron en paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,25% y sacarosa al 3% tamponada con tampón de fosfato 0,05 M, pH 7. Después de incubación durante 2 horas a 25°C y 63 horas a 5°C, las muestras se lavaron 3 x 20 minutos en tampón fosfato 0,05 M, pH 7. Se llevó a cabo la deshidratación utilizando una serie de lavados con etanol (50%, 70%, 80% y 96%), seguida de 3 lavados de etanol al 99% (30 minutos para cada concentración de etanol). Después de tratamiento adicional con 2 x 2 horas en petróleo (Shellsol™ D70k, Q7712) y 2 x 2 horas en parafina con cera de abejas al 7%, las muestras se embebieron en parafina. Los cortes transversales de 12,5 µm se realizaron en un microtomo Supercut 2050 Reichart Jung.

Inmunología

Cortes tisulares preincubados con suero de cerdo al 20% en TBS (0,5 M Tris/HCl pH 7,6, 0,15 M NaCl, Triton X-100 al 0,1%) durante 30 minutos antes del tratamiento durante 1 hora con anticuerpos PME, se diluyeron 1: 50 en TBS. Se eliminó el exceso de anticuerpos mediante lavado con TBS durante 5 x 5 minutos. Después de lavar, los cortes se incubaron durante 30 minutos con anticuerpos secundarios acoplados con fosfatasa alcalina 1:20 en el ensayo TBS. Se eliminó el exceso de anticuerpos secundarios mediante lavado de TBS, tal como se ha descrito anteriormente. Antes de teñir los cortes, éstos se trataron con tampón de acetato de veronal pH 9,2 durante 5 minutos, y realizándose a continuación la tinción con Rojo Rápido y Naftol AS-BI fosfato (Sigma nº N4875) durante 20 minutos. Se eliminó el exceso de reactivo lavando con agua. Se realizaron los controles en paralelo y se trataron con suero preimmune.

Resultados

Las localizaciones inmunológicas con el anticuerpo producido contra la PME de las peladuras, mostraron que la PME se encuentra en grandes cantidades en la capa celular externa de la lamela entre los gajos, en el núcleo y en la capa celular externa de las bolsas de jugo, así como en la capa celular interna de la cáscara blanquecina (véase Figura 1). Estos resultados demuestran que el anticuerpo contra la PME de las peladuras reacciona cruzadamente con la PME de “las partes carnosas de la planta” (estando éstas formadas por los gajos, véase la Figura 1) lo cual indica una acusada homología entre la PME localizada en las peladuras y en las partes carnosas de la planta, respectivamente.

Estudio 2

La PME de las peladuras de la naranja se purificó en grandes cantidades. A este respecto, 70 mg aproximadamente de PME se aislaron de 5 Kg de peladuras de naranja. La PME purificada se utilizó entonces en el ensayo de aplicación utilizando proteínas lácteas, es decir, un yoghurt bebible. En este ensayo, la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque mejoró las propiedades estabilizadoras proteicas, comparada con la pectina no desesterificada, a causa presumiblemente de la estructura en bloque formada. El producto final tenía también una viscosidad favorable.

Isoformas enzimáticas

Aunque no se desea teorizar, se cree que la PME de la presente invención puede existir en al menos dos isoformas. La isoforma S posee un peso molecular de 36 kD aproximadamente, y se puede aludir a ella como “la PME corta”. La isoforma L posee un peso molecular de 64 kD aproximadamente, y a ella se puede aludir como la “PME larga”.

También se cree que la Isoforma L es más térmicamente estable que la Isoforma S. Asimismo, se cree que la Isoforma S pone en marcha la etapa inicial de desesterificación en bloque y es entonces suplantada por la Isoforma L.

En otras palabras, se cree que la Isoforma L puede tener una afinidad más grande con la pectina desesterificada parcialmente que la Isoforma S.

Se piensa que la estabilidad térmica de la Isoforma L puede deberse a la secuencia aminoácida representada como SEC ID nº 5.

Estudios posteriores han mostrado que el gen para la isoforma L posee una extensión N-terminal por encima de la secuencia señal. Esto se muestra diagramáticamente en la Figura 12.

Aislamiento y caracterización de cADNs que codifican pectin metil esterasa obtenible a partir de la naranja

Materiales y métodos para la biología molecular

1. Materiales

Se utilizaron naranjas (*Citrus sinensis*) var. Navel, originales de Marruecos.

ES 2 163 644 T5

2. ADN

Se aisló el ADN genómico tal como se describe por Dellaporta S.L. *et al.* (1983) Plant. Mol. Biol. Rep. 1 (4): 19-21. Se aisló el ADN plasmídico tal como se describe en el documento EP-B-0470145.

3. ARN

Se aisló el ARN total a partir de frutos de naranja maduros. La parte externa de las partes carnosas de la planta y la parte interna de la capa de la cáscara blanquecina (véase Figura 1) de una fruta de naranja Navel, se utilizaron para el aislamiento del ARN según el procedimiento descrito por Logemann, J., Schell J. y Willmitzer L. (1987) Anal. Biochem 163:16-20. "Improved Method for the isolation of RNA from Plat Tissues".

4. PCR

Se utilizó el ARN total de la naranja para llevar a cabo la PCR inversa con el Equipo de PCR Inversa rTth (Perkin Elmer), según las instrucciones de los suministradores con el siguiente ciclo de temperatura:

Transcripción inversa:

70°C 2 min.

60°C 2 min.

50°C 2 min.

45°C 5 min.

40°C 5 min.

30°C 10 min.

42°C 10 min.

70°C 2,5 min.

5°C empapar

Amplificación (PCR)

94°C 2 min.

92°C 1 min.

45°C 2 min.

72°C 2 min. en 40 ciclos

72°C 5 min.

5°C empapar

5. Clonación de los fragmentos PCR

Los fragmentos PCR se clonaron en el sitio *EcoRV* del vector pT7Blue (Novagen) siguiendo las instrucciones de los suministradores.

6. Secuenciación del ADN

Se secuenció el ADN bicatenario esencialmente según el procedimiento didesoxi de Sanger *et al.* (1979) utilizando el Equipo Secuenciador de Auto Lectura (Pharmacia) y el secuenciador LKB A.L.F. ADN de Pharmacia (Ref: Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1979). Secuenciación del ADN con inhibidores determinantes de cadena. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:5463-5467). Los iniciadores utilizados para la secuenciación se listan seguidamente (presentados de 5' a 3'):

UNI (Iniciador M13-20)- 17 Mer

GTAAACGACGGCCAGT

ES 2 163 644 T5

REV - 19 MER

GGAAACAGCTATGACCATG

5

01-20 MER

GACAACGGCAACGAGCCTCA

10

02 - 22 MER

GCACTTGTAATAACCCTAAAT

15

03 - 20 MER

CAGGGTAGTTTCCCGACGTA

20

04 - 20 MER

TACGTCGGGAAACTACCCTG

25

05 - 21 MER

CTCCTGGAAGCTTCATTGCTG

30

06 - 20 MER

GAAGCTTCTTGAAGAGAACG

35

07 - 20 MER

CGTTCTCTTCAAGAAGAAGCTTC

40

08 - 22MER

GAGGATAGCATGATGAGGCTCG

45

09 - 22 MER

GCAGTTCACAAAGAACTGGCGG

50

010 - 22 MER

CCTCATGATCATCATGTCAGTG

55

011 - 21 MER

GCTCCTCAGGGAGGCACTAAG

60

012 - 21 MER

CAGCAATGAAGCTTCCAGGAG

65

013 - 21 MER

CTTAGTGCCTCCCTGAGGAGC

ES 2 163 644 T5

014 - 18 MER

GCCACCGCCTGGTGCTTT

5

015 - 18 MER

AAAGCACCAAGGCGGTGGC

10

016 - 20 MER

GCGGGATGCGTTGTCAGACG

15

017 - 20 MER

GAGGCACTAAGCGGTATATT

20

018 - 18 MER

GCAACTGTAGCAGACTTG

25

019 - 20 MER

CACTGACATGATGATCATGA

30

020 - 20 MER

CAATTAAGCAGTTCACAAAG

35

021 - 20 MER

AATATACCGCTTAGTGCCTC

40

La secuencia nucleótida secuenciada se muestra como SEC ID nº 3 (derivada de pO17) y la SEC ID nº 4 (derivada de pO34). La secuencia N-terminal se muestra como SEC ID nº 6.

7. Rastreo de la genoteca

45

Una genoteca cADN en *lambda zapII* (Stratagene) que se había preparado a partir del ARNm aislado de las partes carnosas y de la capa de la cáscara blanquecina de la naranja, se rastreó con la apropiada sonda PCR marcada radioactivamente. El rastreo se llevó a cabo según las instrucciones de los distribuidores, excepto en que la prehibridación y la hibridación se realizaron en 2 x SSC, SDS al 0,1%, 10 x Denhardt y 100 µg/ml de ADN espermático de salmón desnaturalizado. La hibridación se realizó por la noche a 67°C. Los filtros se lavaron dos veces en 2 x SSC, SDS al 0,1%, dos veces en 1 x SSC, SDS al 0,1% y dos veces en 0,1 x SSC, SDS al 0,1%.

50

8. Sonda

55

El fragmento PCR clonado se aisló del vector pT7 blue mediante digestión con los apropiados enzimas de restricción. El fragmento se separó del vector mediante electroforesis en gel de agarosa y el fragmento se purificó y marcó radioactivamente utilizando el equipo de marcación de ADN Ready to Go™ (Pharmacia).

9. Análisis Southern

60

El ADN genómico de la naranja o el ADN plasmídico se digirieron con los enzimas de restricción apropiados, se transfirieron a membranas HybondN⁺™ y se hibridizaron siguiendo las instrucciones de los suministradores (Amersham).

65

10. Experimentos de hibridación *in situ*

La técnica de hibridación *in situ* se basa en el principio de hibridación al ARNm de una secuencia ribonucleótida antisentido. La técnica se utiliza para visualizar áreas en cortes microscópicos en las que se encuentre dicho ARNm.

ES 2 163 644 T5

En este caso particular, la técnica se utilizó para localizar el ARNm que codifica el enzima pectin metil esterasa en cortes de *C. sinensis*.

Preparación de las muestras de tejido para la hibridación in situ

5 Rebanadas delgadas de la parte media de un fruto maduro de la naranja se fijaron mediante FAA (45% etanol, 5% formalina (40% paraformaldehído) y 5% de ácido acético) e incubación durante 2 horas a 25°C y durante 63 horas a 5°C. Se lavaron las muestras durante 3 x 20 minutos en un tampón 0,05 M fosfato, pH 7. Se llevó a cabo la deshidratación utilizando diversos lavados con etanol (50%, 70%, 80%, 96%), terminando con 3 lavados en etanol al 10 99%. Cada lavado duró 30 minutos. Las muestras se trataron entonces con petróleo (Shellsol™ D70k, Q7712) durante 2 x 2 horas y durante otras 2 x 2 horas en parafina con cera de abejas al 7%. A continuación, las muestras se embebieron en parafina. Se practicaron cortes transversales de 12,5 µm en un microtomo Supercut 2050 Reichart Jung.

Preparación de sondas marcadas con ³⁵S para la hibridación in situ

15 Un fragmento PCR de 501 pares de bases de una segunda amplificación PCR se clonó en el vector pT7blue (Novagen) en ambos sentidos. El vector pT7 contiene un promotor T7. La transcripción del ARN con sentido y del ARN antisentido fue gobernada por el promotor SP7 después de digerir el plásmido con BamHI. Se utilizó un Equipo Maxiscript™ (Ambion) con las modificaciones siguientes. Los transcritos se procesaron en un gel de secuenciación al 6% para eliminar el nucleótido incorporado y se eluyeron con el tampón de elución suministrado con el equipo de 20 transcripción *in vitro* de la T7 ARN polimerasa (Ambion). Los transcritos contenían 55 nucleótidos no codificantes en un extremo y así como 9 nucleótidos no codificantes en el otro. Para la hibridación, se utilizaron 10⁷ cpm/ml de la sonda marcada con ³⁵S.

25 La hibridación *in situ* se realizó esencialmente tal como se describe por Langedale J.A. (1994) en el Maize Handbook-M. Freeling y V. Walbot, editores, páginas 165-180, Springer Verlag, New York, Inc. Se encontró que la temperatura de hibridación era óptima a 57°C. Después de lavar a 57°C, los cortes se cubrieron con una emulsión fotográfica Kodak K-5 y se dejaron durante 3 días a 5°C en la oscuridad.

30 11. Resultados

Se utilizó la siguiente información secuencial para generar iniciadores para las reacciones PCR mencionadas seguidamente y para verificar la secuencia aminoácida generada por las respectivas secuencias nucleótidas (véanse las SEC ID n°s 7-19 adjuntas).

Secuencias peptídicas de pectin metil esterasa utilizadas para la generación de los iniciadores

Asn Cys Asp Met Leu Ala Tyr Gln Asp Thr Leu Tyr (PE492B)

40 Val ILe Thr Ser Ala Thr Glu Ala Gln Ala Phe Thr Pro Gly Ser Phe Ile Ala Gly Ser Ser Trp Leu Gly Ser Thr Gly Phe (PE701)

La secuencia aminoácida (PE492B,4-7) utilizada para generar el iniciador A (Met Leu Ala Tyr Gln Asp Thr)

45 Iniciador A

ATG(CT)T(GATC)GC(GATC)TA(TC)CA(AG)GA(TC)AC 256 mix

La secuencia aminoácida (PE701,7-13) utilizada para generar el iniciador B (Glu Ala Gln Ala Phe Thr Pro)

50 Iniciador B

GT(AG)AA(GATC)GC(TC)TG(GATC)GC(TC)TC 128 mix (la secuencia corresponde a la cadena complementaria)

Generación del fragmento PCR ADN que codifica parcialmente la pectin metil esterasa

55 Se utilizaron las secuencias aminoácidas de los dos péptidos no solapantes (descritos anteriormente) para generar los oligonucleótidos mezclados. Estos se utilizaron como iniciadores para la transcripción inversa y la amplificación subsiguiente (PCR) del ARN total. El clon PCR resultante se secuenció y presentaba un inserto de 501 pares de bases. La secuencia aminoácida deducida a partir de la secuencia nucleótida, se correspondía casi perfectamente con las secuencias peptídicas que se proporcionan en las SEC ID n° s 7-19.

Análisis de la hibridación in situ

65 Los experimentos de hibridación *in situ* (véase Materiales y Métodos) con las ribosondas (producidas a partir de los apropiados clones PCR) contra el ARNm de la pectin metil esterasa, mostraron una hibridación intensa en la capa celular externa de la lamela entre los gajos (véase la Figura 1). Se obtuvieron también señales intensas a partir

ES 2 163 644 T5

de la capa celular externa de las bolsas de jugo, de la capa celular interna de la cáscara blanquecina y de la zona nuclear. Estos resultados se corresponden muy bien con los de las localizaciones inmunológicas que se apreciaron con el anticuerpo producido contra la PME de las peladuras, tal como se describió anteriormente.

5 *Análisis Southern*

El análisis Southern mostró que en el genoma de *C. sinensis* se encuentran copias adicionales de los genes PME aislados (representados por los clones cADN). Estos otros genes PME eran bastante homólogos con los representados en pO17 y pO34.

10 A este respecto, se observó en cada carril una banda de una señal intensa de hibridación, dos bandas de una señal de intensidad media de hibridación, y por lo menos dos bandas más de una señal débil comparada con el resto. Este patrón indica que *C. sinensis* posee al menos entre 5 y 7 copias de los genes PME en el genoma.

15 *Aislamiento y caracterización de los nuevos cADNs PME*

Una genoteca cADN en *lambda zapII* (Stratagene) que se había preparado tal como se describe en Materiales y Métodos, se rastreó con el inserto de 501 pares de bases marcado radioactivamente procedente del clon PCR. Se identificaron varios clones hibridizantes y el ADN plasmídico se extrajo *in vivo* según las instrucciones de los suministradores. El tamaño de los insertos de cADN en los clones se determinó mediante digestión con EcoRV y SmaI, seguida de una electroforesis en gel de agarosa. Un clon pO34 mostraba un tamaño del inserto de aproximadamente 2 kb, mientras que otro clon pO17 mostraba un tamaño del inserto de aproximadamente 1,4 kb. Estos clones se seleccionaron para ulterior análisis. Las secuencias nucleótidas se determinaron y se muestran como SEC ID n° 3 y SEC ID n° 4 para pO17 y pO34, respectivamente.

25 El marco de lectura abierto en O34 que empieza en el nucleótido 29 y termina en el nucleótido 1780, codifica una PME de 584 aminoácidos que incluye un péptido señal putativo. Un posible sitio de fragmentación entre la glicina en posición 46 y la isoleucina en posición 47 puede predecirse según las reglas de von Heijne, G (1986), Nucl. Acids Res. 14, 4683-4690, "A new method for predicting signal sequence cleavage sites", que proporciona por tanto un largo enzima PME maduro de 538 aminoácidos que posee un peso molecular calculado de 58386 daltons. El peso molecular del largo PME incluyendo la secuencia señal puede calcularse en 63502 dalton. La secuencia nucleótida de pO34 incluye una región 5' no traducida de 29 nucleótidos y una región 3' no traducida de 186 nucleótidos, que termina en una cola poli A.

35 El marco de lectura abierto en O17 empieza en el nucleótido 18 y acaba en el nucleótido 1103. Codifica una PME corta de 362 aminoácidos que incluyen un péptido señal de 44 aminoácidos. Puede preverse un sitio putativo de fragmentación entre la glutamina en posición 44 y la serina en posición 45, dejando una PME corta madura que empieza con la secuencia aminoácida Ser-Ser-Ser-Val-Thr-Pro. Esta secuencia aminoácida N-terminal es idéntica a la del tipo corto purificado de PME, tal como se describe en la sección bioquímica. Las secuencias aminoácidas obtenidas a partir del enzima purificado se alinearon con la secuencia aminoácida madura deducida de pO17. Se encontró una identidad total respecto a los fragmentos peptídicos.

45 Existió una identidad prácticamente total entre todos los péptidos secuenciados y la secuencia aminoácida deducida en pO17 y también con la secuencia aminoácida deducida de pO34, la PME larga. A este respecto, pO17 difiere en una posición aminoácida (n° 24 en la secuencia que codifica el polipéptido maduro). La proteína PME corta madura posee un peso molecular calculado de 33954 dalton. El peso molecular calculado de la forma PME corta incluyendo el péptido señal es 39088 dalton. O17 incluye una región 5' no traducida de 17 nucleótidos y una región 3' no traducida de 180 nucleótidos, acabando en una cola poli A.

50 La diferencia mayor entre el enzima PME largo y corto es una extensión N-terminal de 220 aminoácidos que se encuentra en el enzima maduro derivado de O34 y que se presenta como SEC ID n° 5. La secuencia nucleótida correspondiente que codifica esta región del enzima PME largo se muestra como SEC ID n° 6.

Expresión de PME en microorganismos

55 La secuencia de ADN que codifica la forma larga o corta de PME de la naranja se introdujo en microorganismos para producir un enzima recombinante en grandes cantidades con una intensa actividad específica para utilizarse en el tratamiento enzimático de la pectina.

Expresión en Pichia pastoris

60 *Construcción de pJK10, pJK11 y pJK12 (véanse las Figuras 13-15)*

Se utilizó el ADN del plásmido pO34 como ADN matriz en una reacción PCR con el siguiente conjunto de iniciadores:

65 5'-GAATTCATTGTCGCCGAGTGAAC-3' con un sitio *EcoRI* en un extremo y

5'-AAGACCAGAGACCTATGGATCCAC-3' con un sitio *BamHI* cerca del extremo.

ES 2 163 644 T5

El ADN matriz combinando la polimerasa AmpliTaq^R ADN (Perkin Elmer), dATP, dGTP, dCTP y dTTP con el tampón (60 mM Tris-HCl (pH 8,5), 15 mM (NH₄)₂SO₄ y 1,5 mM MgCl₂) y disponiéndolos en un bloque térmico utilizando el siguiente ciclo de temperatura:

- 5 94°C 2 min.
 94°C 1 min.
 55°C 2 min.
10 72°C 2 min. en 35 ciclos
 72°C en 7 min.
15 5°C empapamiento

se produjo el producto PCR esperado de 1690 pares de bases el cual se purificó y subclonó en el vector pT7Blue (de Novagen), siguiendo las instrucciones de los suministradores.

- 20 Los clones resultantes (denominados pT7-O34) que contenían un fragmento *EcoRI-BamHI* del tamaño esperado, se comprobaron ulteriormente mediante secuenciación del ADN (véase Materiales y Métodos para Biología Molecular). Un subclon pT7-O34 que contenía la secuencia correcta se digirió con *EcoRI* y *BamHI* y el fragmento de 1685 pares de bases se purificó y subclonó en el vector pHIL-S1 de *Pichia pastoris* (de Invitrogen) digerido con los mismos enzimas.

- 25 La secuencia que codifica la forma larga madura de PME se clonó de esta manera en marco con la señal de secreción PHO1 (S) en el vector. El plásmido resultante se denomina pJK10 y se muestra en la figura 13.

- 30 Para crear pJK11 (véase la figura 14), el fragmento *EcoRI-BamHI* del clon pT7-O34 se subclonó ulteriormente en un vector pBSK- (de Stratagene) digerido con los mismos enzimas. Entonces, un fragmento *EcoRI-NotI* de uno de los clones resultantes (comprobado mediante secuenciación del ADN), se subclonó en el vector de expresión de *Pichia pastoris* pPIC9 (de Invitrogen) digerido con los mismos enzimas. Esto coloca al marco de lectura codificando la proteína madura, de la forma larga de PME, por debajo y en marco con la señal de secreción del factor alfa (S) en pPIC9 (véase la figura 14).

- 35 Además, el fragmento *EcoRI-NotI* de pT7-034 se subclonó también en el vector pPIC9K (Invitrogen) creando el plásmido pJK12 que se muestra en la figura 15. La única diferencia entre pJK11 y pJK12 es un gen que codifica la resistencia para la kanamicina y éste se sitúa en pJK12.

- 40 Tanto la señal de secreción PHO1 en pJK10 como la señal de secreción alfa en pJK11 y pJK12 pueden dirigir la secreción del polipéptido maduro que codifica la forma larga de PME.

Construcción de pJK20, pJK21 y pJK22

- 45 Se utilizó el ADN del plásmido pO17 como ADN matriz en una reacción PCR con los siguientes iniciadores:

5'-GAATTCTCCTCGTCGGTGACACCG-3' con un sitio *EcoRI* en un extremo y

5'-AAGACCAGAGACCTATGGATCCAC-3' con un sitio *BamHI* cerca del extremo.

- 50 El ADN matriz la polimerasa AmpliTaq^R, dATP, dGTP, dCTP y dTTP se combinaron con el tampón (60 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15 mM (NH₄)₂SO₄ y 1,5 mM MgCl₂) y se dispusieron en un bloque térmico con el siguiente ciclo de temperatura:

- 55 94°C 2 min.
 94°C 1 min.
 55°C 2 min.
60 72°C 2 min. en 35 ciclos
 72°C en 7 min.
65 5°C empapamiento

ES 2 163 644 T5

Esto produjo una banda PCR esperada de 1008 pares de bases que se purificó y subclonó en el vector pT7Blue (Novagen). Los clones resultantes se comprobaron mediante secuenciación del ADN tal como se explicó anteriormente. Un plásmido con la secuencia correcta se digirió con *EcoRI* y *BamHI* y el fragmento resultante se subclonó ulteriormente en el vector pHIL-S1 (Invitrogen), denominándose al plásmido resultante pJK20 (que se muestra en la figura 16) y en éste, es la región que codifica el polipéptido maduro de la forma corta de PME situada en marco y por debajo de la señal de secreción PHO1.

Los plásmidos pJK21 y pJK22 se construyeron de la misma forma que se explicó para pJK11 y pJK12, excepto en que el fragmento *EcoRI-NoI* se obtuvo del clon pBSK-O17. Las Figuras 17 y 18 muestran los plásmidos resultantes en los que la región que codifica el polipéptido maduro se sitúa por debajo, y en marco, de la señal de secreción alfa en pPIC9 y pPIC9K respectivamente.

Introducción de la forma larga o corta de PME en *Pichia pastoris* mediante formación de esferoplastos y transformación

Los plásmidos pJK10, pJK11, pJK12, pJK20, pJK21 y pJK22 se introdujeron en células GS115 de *Pichia pastoris*, en experimentos separados.

A este respecto, se prepararon esferoplastos a partir de células GS115 que se desarrollaron en un extracto de medio de dextrosa peptona (YPD) a 28-30°C. La preparación de esferoplastos y el procedimiento de transformación se llevaron a cabo tal como se describe en el Manual de instrucciones del equipo de expresión de *Pichia* (Invitrogen). Los transformantes Mut⁺ o Mut^s resultantes de *Pichia pastoris* se analizaron entonces respecto a la expresión del gen PME recombinante mediante ensayo del sobrenadante en cuanto a la actividad PME, utilizando los procedimientos descritos en: Materiales y Métodos para Bioquímica.

Rastreo de transformantes respecto a la expresión intensa de la forma larga o corta de PME

Transformantes putativos se desarrollaron ulteriormente en medio mínimo (Medio Mínimo de Dextrosa o Medio mínimo de glicerol tal como se especifica en el Manual de Instrucciones del equipo de expresión de *Pichia*, Invitrogen) y el ADN genómico se aisló y analizó mediante PCR tal como se describe en el Manual de Instrucciones.

Clones positivos que se encontraron en el rastreo inicial, que también produjeron una banda PCR del tamaño esperado, se seleccionaron y se hicieron crecer ulteriormente en un matraz a 28-30°C según el procedimiento descrito en el Manual de Instrucciones *Pichia*.

Se rastrearon en cuanto a la secreción de PME por lo menos 10 clones recombinantes comprobados de cada constructo (pJK10, pJK11, pJK12, pJK20, pJK21 y pJK22) y se evaluó su nivel relativo de expresión a lo largo del tiempo mediante muestreo cada 2 a 6 horas. Las células en las muestras se sedimentaron y el sobrenadante se ensayó respecto a la actividad PME según los métodos explicados en Materiales y Métodos para Bioquímica.

Los clones obtenidos después de transformación con pJK12 ó pJK22 se preseleccionaron utilizando el gen integrado de resistencia a la kanamicina como gen de selección, tal como se describe por Scorer C.A. *et al.* (1994) Bio/Technology vol. 12, pp. 181-184 y Laroche Y. *et al.* (1994) Bio/Technology vol. 12, pp. 1119-1124. De esta manera, se obtuvieron múltiples transformantes de integración de copia, rastreándose ulteriormente tal como se describió anteriormente.

Los transformantes que representaban la forma larga o corta de PME y mostraban expresar la proteína recombinante de manera intensa, se seleccionaron y analizaron ulteriormente mediante análisis de Transferencia Western (véase Materiales y Métodos para Bioquímica).

Purificación y caracterización de la PME recombinante

La proteína PME recombinante se purificó a partir del sobrenadante de los cultivos utilizando, cuando era necesario, los procedimientos descritos en Materiales y Métodos para Bioquímica.

La supuesta estabilidad a las altas temperaturas de la forma larga de la PME, se comprobó mediante ensayo de la actividad enzimática después de incubación a distintas temperaturas, tal como se explica en el apartado: Caracterización y datos cinéticos. Los enzimas recombinantes purificados (tanto la forma larga como la corta de PME) se caracterizaron ulteriormente tal como se explica en el apartado: Caracterización y datos cinéticos. Estos análisis mostraron que ambos tipos presentaban un pH óptimo de 7-8-aproximadamente y se encontró que la estabilidad térmica de la PME recombinante corta estaba entre 10 y 40°C y era superior a 80°C para la PME recombinante larga.

Expresión en *Aspergillus niger*

En otra forma de realización, pO34 ó pO17 se digirieron con los enzimas de restricción apropiados y la secuencia codificante para la forma larga o corta de PME de la presente invención, se clonó en el vector de expresión pBAMTE1 de *Aspergillus* (que contiene el promotor de *Neurospora crassa* de resistencia al metil triptófano) para la expresión en *Aspergillus niger* (Pall *et al.* (1993), Fungal Genet Newslett. vol. 40, pp. 59-62).

ES 2 163 644 T5

Los protoplastos se prepararon según Daboussi *et al.* (Curr Genet (1989) vol. 15, pp. 453-456) utilizando las enzimas líticas Sigma L-2773 y la liticasa Sigma L-8012. La transformación de los protoplastos siguió el protocolo establecido por Buxton *et al.* (Gene (1985) vol. 37, pp. 207-214) excepto en que para sembrar los protoplastos transformados se siguieron las indicaciones expuestas en Punt *et al.* (Methods in Enzymology (1992) vol. 216 pp. 447-457), pero utilizando agarosa superficial osmótica al 0,6% estabilizada.

Los resultados mostraron que la actividad PME purificada de la naranja se podía obtener a partir de cultivos de *Aspergillus niger*.

10 Utilizaciones

Efecto de la pectina tratada con la PME de la naranja sobre la viscosidad y estabilidad de las bebidas proteicas

Métodos

15

Tratamiento enzimático de la pectina con PME derivable de la naranja

Se preparó un lote de pectina tratada enzimáticamente, de la siguiente manera:

20

125 g de pectina se disolvieron en agua caliente bajo agitación eficiente. Se añadieron 45,3 g de NaCl (grado reactivo) y se ajustó el volumen a 4,0 l con agua. Esta solución se agitó hasta que la sal se hubo disuelto. La solución de pectina se enfrió a 40°C y el pH se aumentó hasta 7,0, utilizando 1 N NaOH (grado reactivo) y agitación eficiente. Se añadió una muestra apropiada de PME de naranja y la reacción enzimática continuó hasta que el grado deseado de desesterificación se hubo alcanzado. El pH se mantuvo constante a 7 mediante la dosificación automática de 1N NaOH (grado reactivo) durante el período de incubación, siguiendo a la reacción enzimática el consumo de NaOH.

25

Cuando la muestra de pectina alcanzó el grado deseado de desesterificación, se detuvo la adición de NaOH, disminuyéndose el pH de la solución hasta 3,0 aproximadamente añadiendo HCl al 2%. La solución de pectina se calentó entonces hasta 70°C durante 5 minutos para inactivar completamente el enzima. La pectina tratada se precipitó con 1 volumen de isopropanol, se lavó con isopropanol al 60% y se prensó hasta conseguir un 50% de sequedad aproximadamente. El lote de pectina "enzimática" se secó entonces al aire a 40°C y finalmente se trituró hasta obtener un polvo seco.

30

Protocolo

35

Determinación de muestras de pectina respecto al índice de sensibilidad al calcio (CF)

La sensibilidad al calcio se mide como la viscosidad de una pectina disuelta en una solución con 57,6 mg de calcio/g pectina, dividida por la viscosidad de exactamente la misma cantidad de pectina en solución, pero sin añadir calcio. Una pectina que no es sensible al calcio tiene un valor CF de 1.

40

Una muestra de pectina de 4,2 g se disolvió en 550 ml de agua caliente con agitación eficiente. La solución se enfrió hasta 20°C aproximadamente y el pH se ajustó hasta 1,5 con 1N HCl. La solución de pectina se ajustó a 700 ml con agua y se agitó. 145 g de esta solución se midieron individualmente en 4 recipientes de viscosidad. A dos de los recipientes se añadieron (determinaciones dobles) 10 ml de agua, y 10 ml de una solución de 250 mM CaCl₂ se añadió a los otros dos recipientes bajo agitación.

45

50 ml de un tampón de acetato (0,5 M, pH 4,6 aproximadamente) se añadieron a la totalidad de 4 recipientes de viscosidad bajo agitación magnética eficiente, haciendo de este modo que el pH de la solución de pectina se remonte por encima de pH 4,0. Se retiran los imanes y los recipientes se dejan por la noche a 20°C. Las viscosidades se miden al día siguiente con un viscosímetro Brookfield. El índice de sensibilidad al calcio se calcula de la manera siguiente:

50

$$CF = \frac{\text{Viscosidad de una solución con 57,6 mg de Ca}^{2+} / \text{g de pectina}}{\text{Viscosidad de una solución con 0,0 mg Ca}^{2+} / \text{g de pectina}}$$

55

Determinación del grado de esterificación (% DE) de muestras de pectina

A 50 ml de una solución de isopropanol al 60% y de HCl al 5%, se añaden 2,5 g de la muestra de pectina y se agita durante 10 minutos. La solución de pectina se filtra a través de un filtro de vidrio y se lava 6 veces con 15 ml de la solución isopropanol al 60%/HCl al 5%, seguido de lavados posteriores con isopropanol al 60%, hasta que el filtrado está libre de cloruros. El filtrado se seca por la noche a 80°C.

60

20,0 ml de 0,5 N NaOH y 20,0 ml de 0,5 N HCl se combinan en un matraz cónico, añadiéndose 2 gotas de fenoltaleína. Esto se titula con 0,1 N NaOH hasta que se obtenga un cambio de color permanente. El 0,5 N HCl deberá ser ligeramente más fuerte que el 0,5 N NaOH. El volumen añadido de 0,1 N NaOH se anota como V_o.

65

ES 2 163 644 T5

0,5 g de la muestra de pectina seca (el filtrado) se mide en un matraz cónico y la mezcla se humedece con etanol al 96%. Se añaden 100 ml de agua destilada recientemente hervida y enfriada, agitando la solución resultante hasta que la pectina esté completamente disuelta. Entonces, se añaden 5 gotas de fenolftaleína y la solución se titula con 0,1 N NaOH (hasta que se produzca un cambio en el color y el pH sea de 8,5). La cantidad de 0,1 N NaOH que se utiliza en la presente memoria se anota como V_1 . Se añaden 20,0 ml de 0,5 N NaOH y el matraz se agita vigorosamente, dejándolo entonces reposar durante 15 minutos. Se añaden 20,0 ml de 0,5 N HCl y el matraz se agita hasta que el color rosa desaparece. Se añaden entonces 3 gotas de fenolftaleína y entonces la solución resultante, se titula con 0,1 N NaOH. El volumen 0,1 N NaOH utilizado se anota como V_2 .

El grado de esterificación (% DE: % de grupos carboxílicos totales) se calcula de la manera siguiente:

$$\% \text{ DE} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 + (V_2 - V_0)}$$

Producción de yoghurt

Leche desnatada estandarizada (preparada mezclando leche en polvo con un volumen adecuado de agua), se calentó a 90°C en 5 minutos, homogenizándose entonces a 200 kp/cm² y enfriándose la leche hasta 31°C. Se añadió cultivo de yoghurt y la leche fermentó a pH de 4,0 aproximadamente. Se enfrió el yoghurt hasta 20°C aproximadamente y la muestra de pectina se añadió como una solución saturada de azúcar (alrededor de 65% de azúcar), agitándose durante 15 minutos. Se ajustó el pH a 4,0 con ácido láctico. Se pasteurizó el yoghurt a 88°C durante 15 segundos y se homogenizó a 150 kp/cm², enfriándose entonces hasta 20°C y vertiéndolo en recipientes estériles de 250 ml con tapadera azul (200 ml/recipiente).

La composición del producto final fue: 7,6% MSNF (contenido sólido de leche), 9,15% de azúcar y 0,25% ó 0,35% de muestra de pectina, dando unos sólidos totales de 17,0% ó 17,10%, respectivamente.

Determinación de la viscosidad de la bebida de yoghurt

La viscosidad de una muestra de yoghurt se determinó (determinación doble) utilizando un Reómetro Bohlin™ (suministrado por Bohlin Instruments) con índices del “esfuerzo cortante” de 18,5-46,0 ó utilizando un Stress Tech™ (Rheologica Instruments AB) con idénticos índices de cizallamiento.

Estabilidad de las proteínas medida mediante un ensayo de centrifugación

20 g de una muestra (por ejemplo yoghurt para beber) se centrifugó a 10°C, 2300 x g, durante 20 minutos. Se desechó el sobrenadante y se situó invertido el recipiente de la centrifuga durante 30 minutos. Este recipiente se pesó y el porcentaje de sedimentación se calculó de la manera siguiente:

$$\% \text{ Sedimentación} = \frac{\text{Peso del recipiente después de centrifugación} - \text{peso del recipiente}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

en la que Wgt= peso y centri = centrifugación

Estabilidad proteica juzgada por la distribución del tamaño de las partículas en la muestra

La distribución del tamaño de las partículas de una muestra de yoghurt, se determinó utilizando un “clasificador de tamaños” Malvern 2600 Easy™. El tamaño de la partícula se determina en este método mediante la dispersión de la luz láser. Una muestra de yoghurt de 1 ml se añadió a 9 ml de solución tampón (0,1 M ácido cítrico al 30,7%, 0,2 M Na₂PO₄ al 19,3% y 50% de agua), mezclándose. El tampón se añade al recipiente de medida y la mezcla muestra/tampón se añade gota a gota hasta que se obtiene la concentración óptima. El tamaño promedio de la partícula se calcula a partir de las mediciones.

Un yoghurt con el tamaño promedio de partícula inferior a 3 μm aproximadamente se considera bastante estable, mientras que un yoghurt con un tamaño promedio de partícula por encima de 10 μm aproximadamente y mayor, no se considera estable para un almacenamiento a largo plazo.

Determinación de la estabilidad a largo plazo

Se conservaron las muestras a 4°C o a la temperatura ambiente y se midió la separación del suero (en mm de suero en la parte superior de la muestra, en el recipiente). La muestra se vertió en recipientes de 250 ml con tapadera azul (determinaciones dobles). La profundidad de la muestra en cada caso fue aproximadamente de 70 mm - que correspondió a la marca de 200 ml para cada recipiente.

Ejemplo 1

Bebida de leche agria

5 La finalidad de añadir pectina a una bebida láctea agria (por ejemplo, una bebida de yoghurt) es producir una bebida que se conserve físicamente homogénea durante el período de tiempo bacteriológico y organoléptico de conservación de la bebida. Además el tratamiento de la bebida de yoghurt para un almacenamiento a largo plazo desestabiliza la proteína en ella, dando lugar a una bebida con sensación bucal arenosa y que muestra una sinéresis bastante rápida, si no se añade la pectina.

10 *Tratamiento de la pectina*

Se seleccionó una pectina muy esterificada disponible comercialmente, Grindsted™ Pectin URS (tipo de pectina Ultra Rapid Set) como la pectina “madre”, debido a su alto nivel en ésteres (% DE de 82, véase la figura 19). El tratamiento con el enzima PME de naranja de esta pectina “madre” se explica en el apartado de métodos.

La reacción enzimática se detuvo y la pectina experimental resultante (denominada pectina nº 1944-96-2) se investigó en cuanto a su grado de esterificación, mediante el método descrito en el apartado de métodos. Además, para comparar los dos tipos de pectina, la pectina “madre” y la pectina tratada, con un tipo de pectina del yoghurt bebible comercial bien conocido, se incluyó el Grindsted™ Pectin AM453 en los experimentos.

La sensibilidad relativa al calcio de las tres pectinas seleccionadas se determinó tal como se explica en el apartado de métodos: Determinación del índice de sensibilidad al calcio de las muestras de pectina (CF), y los resultados se muestran en la Tabla siguiente:

25

Tipo de pectina	Δ CF	DE%
Grindsted™ Pectin URS	1,1	82
Pectin 1944-96-2	1,4	76
Grindsted™ Pectin AM453	> 20	72

30

La desesterificación de la pectina “madre” Grindsted™ Pectin URS desde el nivel de esterificación (% DE) de 82 al de 76, casi no produjo cambio en la sensibilidad al calcio de estas dos pectinas (una Δ CF de 1 no posee sensibilidad). Podría producirse una pectina con sensibilidad al calcio medible mediante tratamiento ulterior con el enzima PME de la naranja sobre la pectina “madre”, disminuyendo el nivel de esterificación hasta el 70%, ya que esta pectina tenía un Δ CF de 14.

40 *Resultados del análisis yoghurt/yoghurt bebible*

El yoghurt se produjo tal como se explica en el apartado de métodos. Se utilizaron individualmente las tres pectinas (Grindsted™ Pectin URS, Pectin 1944-96-2 y Grindsted™ Pectin AM453) en las siguientes recetas:

45 MSNF al 7,6% (contenido sólido de leche), azúcar 9,15% y muestra de pectina del 0,25% ó 0,35%, dando unos sólidos totales del 17,0% o del 17,10%, respectivamente, en el producto final.

La calidad del yoghurt individual producido se investigó mediante su porcentaje de sedimentación, que se apreció en el ensayo de centrifugación, midiendo el tamaño de las partículas en el mismo, evaluando la viscosidad y mediante el examen de la posible separación del suero durante el almacenamiento a largo plazo, tal como se describe en el apartado de métodos.

50

La sedimentación del yoghurt producido con los tres tipos de pectina se presenta en la Tabla que sigue.

55 *Sedimento (en%) del yoghurt*

Tipo pectina	Concentración - 0,25%	Concentración - 0,35%
Grindsted™ Pectin URS	29,40	21,02
Pectin 1944-96-2	1,53	2,95
Grindsted™ Pectin AM453	2,20	1,85

60

65 Los resultados son el promedio de una a cuatro producciones individuales.

Resulta claro que la pectina “madre” (tipo URS) presentó un porcentaje alto de sedimentación y consecuentemente, el yoghurt producido mostraba separación del suero y fue inestable a las dos concentraciones utilizadas de pectina (0,25

ES 2 163 644 T5

y 0,35%). Esto no sorprende, ya que normalmente, el tipo de pectina URS no puede utilizarse para la estabilización de los tipos de yoghurt tratados térmicamente durante un almacenamiento a largo plazo.

El yoghurt producido con la Pectina 1944-96-2 mostraba estabilidad con las dos dosis de pectina utilizadas y baja sedimentación, tal como puede apreciarse por los resultados anteriores, y porque no se produjo separación del suero después de 75 días de almacenamiento. En comparación, la excelente Grindsted™ Pectin AM453 utilizada normalmente en la producción del yoghurt mostró también baja sedimentación, tal como se esperaba, y produjo yoghurts estables sin separación del suero (véanse resultados anteriores).

Tratando la pectina URS “madre” con PME de naranja, una pectina no apropiada se convirtió en apropiada como agente estabilizante en el yoghurt, y esta pectina tratada actuó justamente como un estabilizador comercial excelente.

Se llevó a cabo el examen ulterior de los yoghurts producidos mediante la determinación del tamaño de las partículas (véase el apartado de métodos), y los resultados se muestran en la Tabla que sigue.

Tamaño de partículas (en μM) del yoghurt

Tipo pectina	Concentración - 0,25%	Concentración - 0,35%
Grindsted™ Pectin URS	9,32	6,41
Pectin 1944-96-2	1,33	1,55
Grindsted™ Pectin AM453	1,40	1,53

El tamaño promedio de las partículas (se muestra el número que corresponde a la fracción D (4.3) utilizando el instrumento de Malvern), del yoghurt producido con la pectina URS “madre” es alto, tal como se esperaba. Una vez más, los resultados, constituyen un promedio de una a cuatro producciones.

El tamaño promedio de las partículas del yoghurt producido tanto a partir de la pectina 1944-96-2 como de la Grindsted™ Pectin AM453 es pequeño, con las dos dosis de pectina utilizadas (véanse resultados anteriores). Ello muestra otra vez que los yoghurts producidos con estos tipos de pectina son apropiados para producir yoghurts estables.

Finalmente, y de manera importante, en el caso de la producción del yoghurt bebible para almacenamiento a largo plazo, se determinó la viscosidad y los resultados se muestran en la Tabla que sigue.

Viscosidad (en MPa s) del yoghurt

Tipo pectina	Concentración - 0,25%	Concentración - 0,35%
Grindsted™ Pectin URS	55	40
Pectin 1944-96-2	12	18
Grindsted™ Pectin AM453	24	43

Debido a que la pectina URS “madre” podría no estabilizar el yoghurt, la viscosidad obtenida es, tal como se esperaba, bastante alta para las dos concentraciones de la pectina. La excelente Grindsted™ Pectin AM453 que produjo yoghurts estables con baja sedimentación y tamaños pequeños de las partículas, mostró una viscosidad la mitad aproximadamente que la apreciada con la Grindsted™ Pectin URS con la dosis (de pectina) del 0,25% y aproximadamente la misma viscosidad que la de la URS con la dosis del 0,35% - sin tener en cuenta el hecho de que sólo la pectina AM453 produjo un yoghurt estable.

En ambos casos, el de la URS y el de AM453, la alta viscosidad apreciada podría atribuirse a la cantidad de pectina añadida, pareciendo ser especialmente esta la situación en el caso de la pectina AM453, ya que un aumento en la cantidad de lectina añadida (de 0,25 a 0,35%) produjo un yogurt casi el doble de viscoso.

La viscosidad obtenida con la pectina 1944-96-2 tratada con PME de naranja, muestra una disminución importante comparada con la pectina URS “madre” a una concentración de 0,25%. Esto se debe parcialmente a la estabilización del yogurt con la pectina 1944-96-2, pero no es la única razón, ya que el yoghurt AM453 posee, con esta dosis de pectina, una viscosidad del doble. En realidad, añadiendo el 0,35% de la pectina 1944-96-2 al yoghurt, la viscosidad aumenta sólo en 6 unidades (comparado con la dosis de 0,25%), mientras que en el caso de AM453, la viscosidad aumenta en 10 unidades, yendo desde 0,25% a 0,35%.

La pectina 1944-96-2 tratada con la PME de naranja puede estabilizar al yoghurt teniendo una viscosidad muy baja, a pesar de que la dosis de pectina fue del 0,25% (ó del 0,35%), lo cual produjo una viscosidad casi del doble utilizando otras pectinas no tratadas, por ejemplo la Grindsted™ Pectin AM453.

ES 2 163 644 T5

Esto constituye un desarrollo nuevo y muy importante para la producción de bebidas lácteas agrias.

Tratando la Grindsted™ Pectin URS con la PME de naranja, se crea un nuevo tipo de pectina que, por contraste con la pectina “madre”, puede estabilizar el yoghurt y, de forma más importante, muestra una viscosidad mucho más baja que las pectinas utilizadas normalmente. Otras pectinas muy esterificadas pueden también ser mejoradas mediante el tratamiento con la PME de naranja.

Ejemplo 2

Bebida de jugo sérico

La pectina modificada según la presente invención (tal como se ha preparado anteriormente) se utilizó en una bebida de jugo sérico de la manera siguiente:

Suero ácido o dulce	42,00%
Jugo de frutas	40,00%
Azúcar	8,0%
Citrato sódico	0,20%
Pectina modificada por PME	0,20%
Aroma de Grindsted	+
Agua	9,60%

La pectina seca modificada por PME, el citrato sódico y el azúcar se mezclaron y disolvieron entonces en agua a 80°C. Esta solución pectínica se enfrió hasta por debajo de 5°C, añadiéndose suero a esta misma temperatura. Aroma Grindsted (suministrado por Danisco Ingredients, Danisco A/S) y jugo se añadieron lentamente, ajustándose el pH en la mezcla de la muestra con ácido cítrico o ácido láctico hasta pH 4,0. La mezcla de la muestra se envejeció aproximadamente durante 30 minutos bajo agitación. Se llevó a cabo la pasteurización a 80°C/15 segundos y la homogenización a 200 bar (2900 psi). Las muestras se enfriaron hasta 20°C y se almacenaron asépticamente en contenedores.

Los ensayos de la muestra se analizaron después de una incubación de 24 horas, 1 mes y 6 meses a temperatura ambiente. Los análisis de investigación incluyeron mediciones de la viscosidad, índice de estabilidad, tamaño de las partículas y estabilidad a largo plazo; cuyos protocolos se han descrito anteriormente.

Los resultados mostraron una estabilidad mejorada y una estabilidad a largo plazo en la bebida de jugo sérico procesada con la pectina modificada por la PME, comparado con la pectina de referencia utilizada en los ensayos de control. Además, la bebida de jugo sérico presentaba una viscosidad favorable que fue más baja que las bebidas de control.

La bebida de jugo sérico se procesó también con pectina de lima y de limón modificada por la PME, respectivamente, es decir, con la PME de la presente invención. Los resultados muestran que la pectina modificada por la PME posee una estabilidad proteica mejorada, comparada con la pectina no modificada y comparada también con la pectina de referencia.

Ejemplo 3

Bebida de jugo de frutas/leche

Grindsted™ URS (obtenido de Danisco Ingredients, Danisco, A/S), se modificó con la PME tal como se describe para la bebida de yoghurt. La pectina modificada se utilizó en una bebida de jugo de frutas/leche que contenía:

Leche desnatada	45,00%
Jugo de frutas	40,00%
Azúcar	5,00%
Pectina modificada por PME	0,25%
Aroma Grindsted	+
Agua	9,75%

La pectina seca modificada por PME y el azúcar se mezclaron y disolvieron entonces en agua a 80°C. Esta solución pectínica se enfrió hasta por debajo de 5°C, añadiéndose leche a esta misma temperatura. Se añadieron aroma Grindsted

ES 2 163 644 T5

y jugo lentamente, ajustándose (si era necesario) el pH en la mezcla de la muestra con ácido cítrico o ácido láctico hasta pH 4,0. La mezcla de la muestra se envejeció, se pasteurizó y se homogenizó tal como se describe para la bebida de jugo sérico. Las muestras se enfriaron hasta 20°C y se almacenaron asépticamente en contenedores.

5 Los resultados mostraron una estabilidad mejorada- incluyendo la estabilidad a largo plazo- en la bebida de jugo de frutas/leche procesada con la pectina modificada por PME, comparada con la pectina de referencia utilizada en los ensayos de control. Además, la bebida de jugo de frutas/leche mostraba una viscosidad favorable que fue más baja que la de las bebidas de control. Se observó también una funcionalidad mejorada.

10 La bebida de jugo de frutas/leche puede ser procesada también con pectina de lima y limón modificada por la PME de la presente invención.

Ejemplo 4

15 *Estabilidad sérica*

Las pectinas modificadas enzimáticamente se ensayaron a un pH de 4,0. El pH de las soluciones de pectina resultantes se ajustó a pH 4,0 con KOH/HCl. La concentración de pectina se ajustó a 1,0%. Las pectinas se ensayaron en concentraciones de 0,1%-0,25%. La pectina, el tampón Jenness (véase seguidamente) y la solución sérica (véase seguidamente), se mezclaron y calentaron a 96°C durante 25 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 500 nm.

25 *Tampón Jenness de mezcla seca*

Jenness Polvo Seco (descrito en Jenness, R y Koops, J., *Preparation and Properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate*, Nederlands Mel-en Zuiveltijdschrift, vol. 16, n° 3, pp. 153-164, 1962):

15,80 g KH_2O_4

30 5,08 g citrato K_3

17,91 g citrato $\text{Na}_3, 2.\text{H}_2\text{O}$

35 1,80 g K_2SO_4

13,20 g $\text{CaCl}_2, 2.\text{H}_2\text{O}$

40 5,02 g citrato $\text{Mg}_3, \text{H}_2\text{O}$

3,00 g K_2CO_3

10,78 g KCl

45 Solución de tampón:

Solución acuosa de 7,5900 g/l de Jenness Polvo Seco con un pH de 4,0.

50 *Solución de suero*

Un concentrado de proteína sérica se liofiliza y pulveriza. Se prepara una solución de proteína sérica del 0,40% peso/peso en el Tampón de Jenness a pH 4,0.

55 *Soluciones de pectina*

Se preparan soluciones acuosas al 1% peso/peso de pectinas con un pH de 4,0.

Concentraciones de la mezcla

60 Las soluciones de Pectina, del Tampón de Jenness y de la Solución Sérica se mezclan tal como se indica en la Tabla siguiente. Las mezclas se calientan a 96°C durante 25 minutos y después de enfriar a temperatura ambiente, las muestras se miden en un espectrofotómetro a 500 nm.

65

ES 2 163 644 T5

μl solución pectina	μl Tampón Jenness	μl solución sérica	μl volumen total
500	2000	2500	5000
750	1750	2500	5000
1000	1500	2500	5000
1250	1250	2500	5000

10 Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla que sigue. El valor de absorbancia citado a 500 nm es un valor medio tomado a partir de dos mediciones. Para comparación entre los distintos tipos de pectina y las pectinas modificadas enzimáticamente según la presente invención, el índice para la pectina no modificada Grindsted™ 3450 (suministrada por Danisco Ingredients, Danisco A/S) se fija en 100.

Un Índice > 100 indica una estabilidad proteica más pobre que utilizando la muestra 3450. Un Índice de 100 indica una estabilidad similar que la muestra 3450. Un Índice < 100 indica una estabilidad proteica mejor que utilizando la muestra 3450. Un Índice de 95 o < 95 indica una estabilidad proteica muy buena.

Tipo pectina	pectina 0,10%	pectina 0,15%	pectina 0,20%	pectina 0,25%
Grindsted™ Pectin 3450	100	100	100	100
Grindsted™ Pectin URS	127	140	155	161
enz 5 min.	100	108	115	113
enz 10 min.	98	106	111	111
enz 15 min.	92	94	100	100
enz 20 min.	90	95	100	99

Como puede apreciarse a partir de los resultados, la pectina Grindsted™ URS modificada según la presente invención, muestra propiedades favorables y en algunos casos muy buenas para aumentar la estabilidad, cuando se comparó con la pectina Grindsted™ 3450 de referencia y la pectina Grindsted™ URS no modificada.

40 Ejemplo 5

Bebida Laban con un largo tiempo de caducidad, bajo pH

La bebida Laban es una bebida láctea acidificada, con un valor pH por debajo de 4,2. La bebida Laban está compuesta por una base Laban mezclada con una solución de pectina. La fórmula para la base Laban es:

Grasa de leche anhidra	2,8%
Polvo de leche desnatada	10,0%
Aroma Grindsted	+
Agua	87,2%

Leche entera estandarizada (grasa de leche anhidra y polvo de leche desnatada) se homogenizó a 75-80°C y a una presión de 200 bar (2900 psi), seguido de pasteurización a 90-95°C durante 5-10 minutos. Después de cultivar a un pH de 4,0 aproximadamente, éste se ajustó a 3,8-4,2 con ácido cítrico o láctico. A continuación se añadió la solución de pectina. La mezcla se agitó entonces hasta que se obtuvo homogénea. Se pasteurizó entonces a 90-95°C durante 10-15 segundos, homogeneizándose ulteriormente a 150-200 bar. Después de enfriar hasta 20-25°C, el producto se vertió asépticamente en contenedores.

Tras unos días, la bebida Laban no estabilizada sufre a menudo sinéresis.

Sin embargo, la adición de pectina modificada enzimáticamente según la presente invención, evita la sinéresis y mejora la viscosidad.

Además, el producto posee un sabor pronunciado a yoghurt y un tiempo prolongado de conservación.

ES 2 163 644 T5

Ejemplo 6

Jugo de naranja (enriquecido en proteínas)

5 La bebida de jugo de naranja es una bebida acidificada (pH aproximado de 4) que contiene un 2% de DANPRO-
LACT 40™ (Central Soya, Aarhus A/S), 6% de azúcar, 10% de concentrado de naranja, 0,4% de concentrado de
limón, 0,2% de pectina y 81,4% de agua. El producto es una bebida de jugo de naranja enriquecida con proteína de
soja. El producto se pasteuriza y se homogeniza. Después de enfriar hasta 20-25°C, se rellenan asépticamente con el
10 producto contenedores y puede conservarse durante aproximadamente 6 meses a temperatura ambiente. La adición
de pectinas modificadas enzimáticamente según la presente invención a las naranjadas (enriquecidas en proteínas),
mostró propiedades favorables- tales como una estabilidad a largo plazo- y buena sensación de la boca.

Ejemplo 7

Producción de anticuerpos

Se produjeron anticuerpos contra el enzima de la presente invención inyectando a conejos con el enzima purificado
y aislando las inmunoglobulinas a partir del antisuero, según los procedimientos descritos según N. Harboe y A.
20 Ingild ("Immunization, Isolation of Immunoglobulins, Estimation of Antibody Titre" en: A Manual of Quantitative
Immuno-electrophoresis. Methods and Applications, N.H. Axelsen, *et al.* (editores). Universitetsforlaget, Oslo, 1973)
y por T.G. Cooper ("The Tools of Biochemistry", John Wiley & Sons, New York, 1977).

Otras modificaciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia, sin apartarse
25 del alcance de la presente invención.

En las páginas siguientes, se presentan diversos listados secuenciales que se han numerado consecutivamente desde
la SEC ID n° 1 a la SEC ID n° 19, que representan secuencias nucleótidas y secuencias aminoácidas.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 163 644 T5

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento que comprende proporcionar una pectina y añadir a dicha pectina un enzima recombinante que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas como SEC ID n° 1 o SEC ID n° 2 o que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 75% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas como SEC ID n° 1 o SEC ID n° 2 para proporcionar una pectina desesterificada enzimáticamente en bloque, en el que la pectina es una pectina muy esterificada, y añadir la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque a un entorno ácido, que contiene por lo menos una proteína.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el entorno ácido es una solución acuosa, preferentemente en el que la solución acuosa es una bebida.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la bebida es un yoghurt bebible, un jugo de frutas o una bebida que comprende proteínas séricas.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína se deriva de, o es capaz de derivarse de, o se encuentra en un producto lechero, tal como leche o queso.

20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la proteína es caseína o la proteína sérica.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el entorno ácido posee un pH comprendido entre 3,5 y 5,5 aproximadamente, en el que el entorno ácido posee preferentemente un pH de 4 a 5,5 aproximadamente.

25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el entorno ácido posee un pH de 4 aproximadamente.

30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pectina desesterificada enzimática en bloque contiene entre 70% y 80% aproximadamente de grupos éster, preferentemente un 76% aproximadamente de grupos éster.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque un peso molecular alto.

35 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la pectina desesterificada enzimáticamente en bloque se prepara tratando una pectina con una pectin metil esterasa recombinante que desesterifica dos o más residuos adyacentes de ácido galacturónico de la pectina sobre la totalidad, al menos sustancialmente, de las cadenas pectínicas.

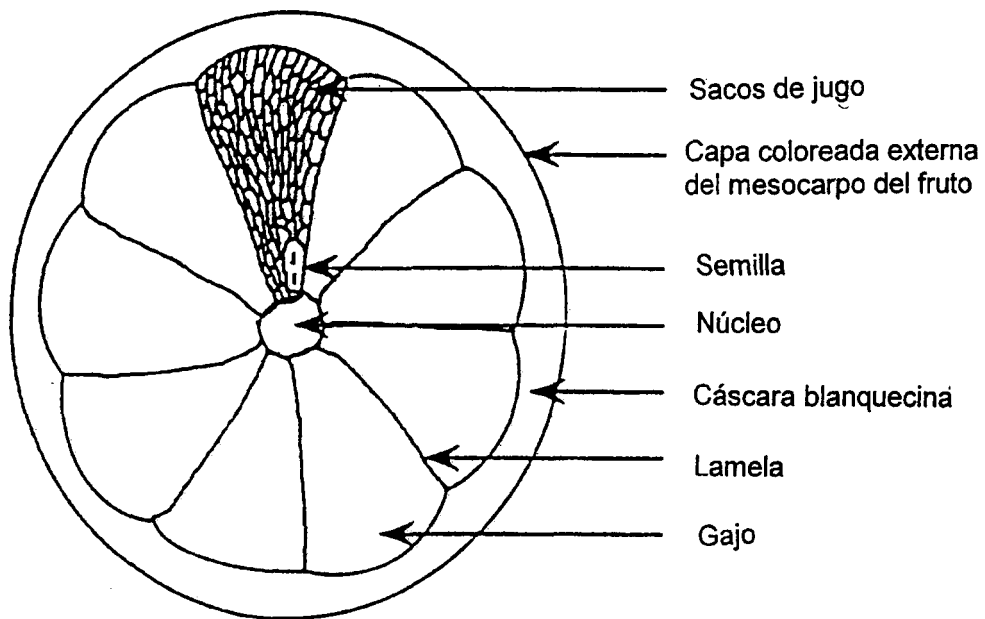


Figura 1. Diagrama esquemático de un fruto cítrico

Fig. 2

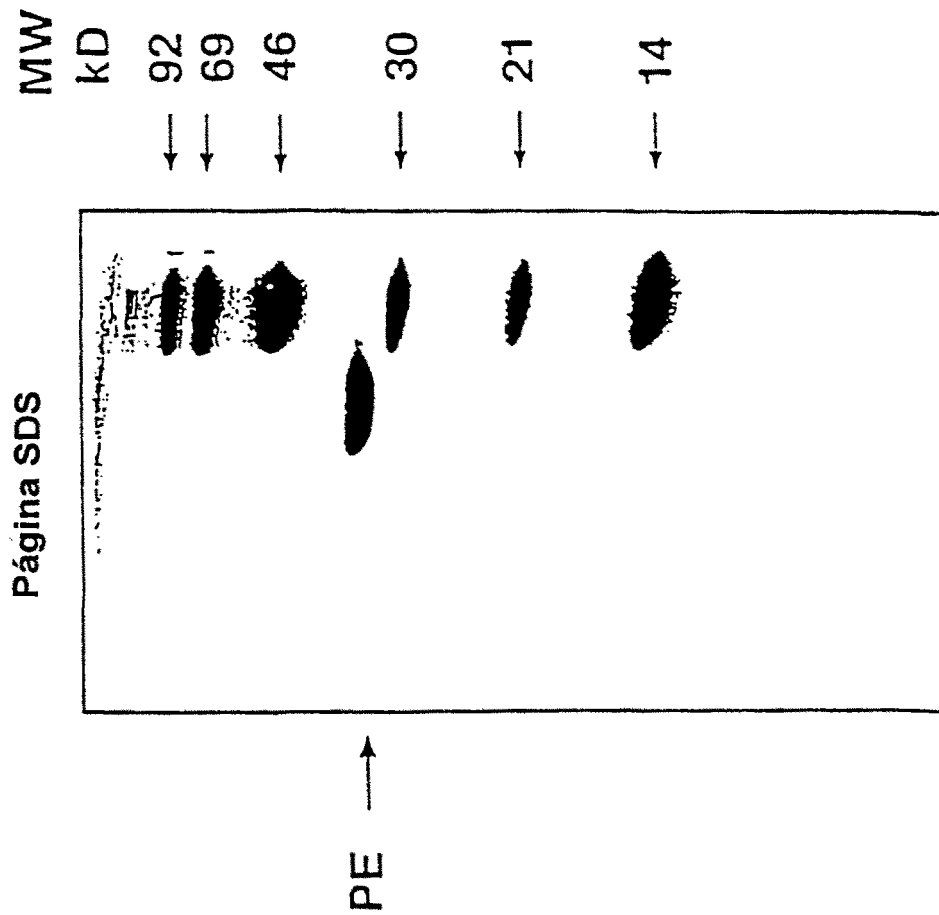


Fig. 3

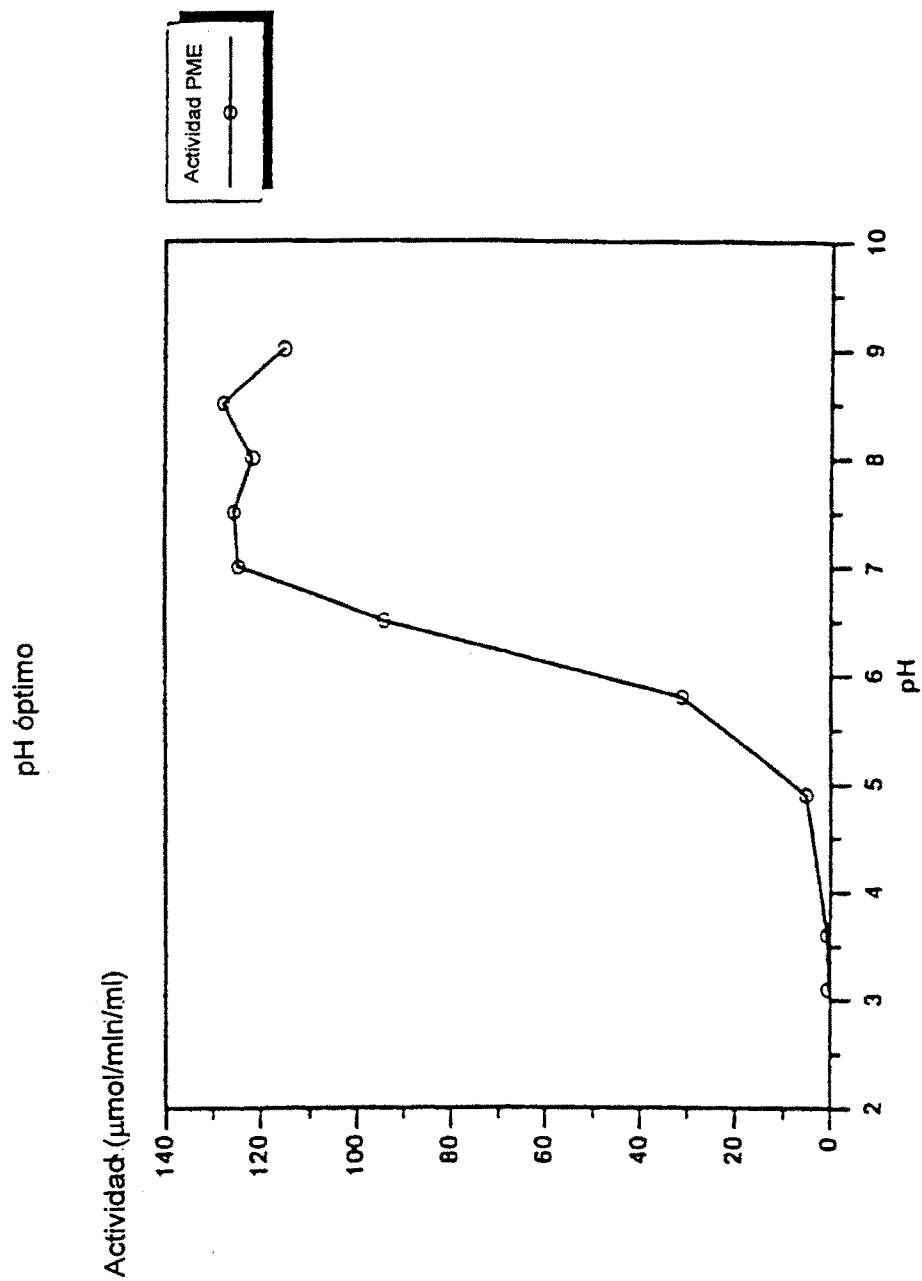


Fig. 4

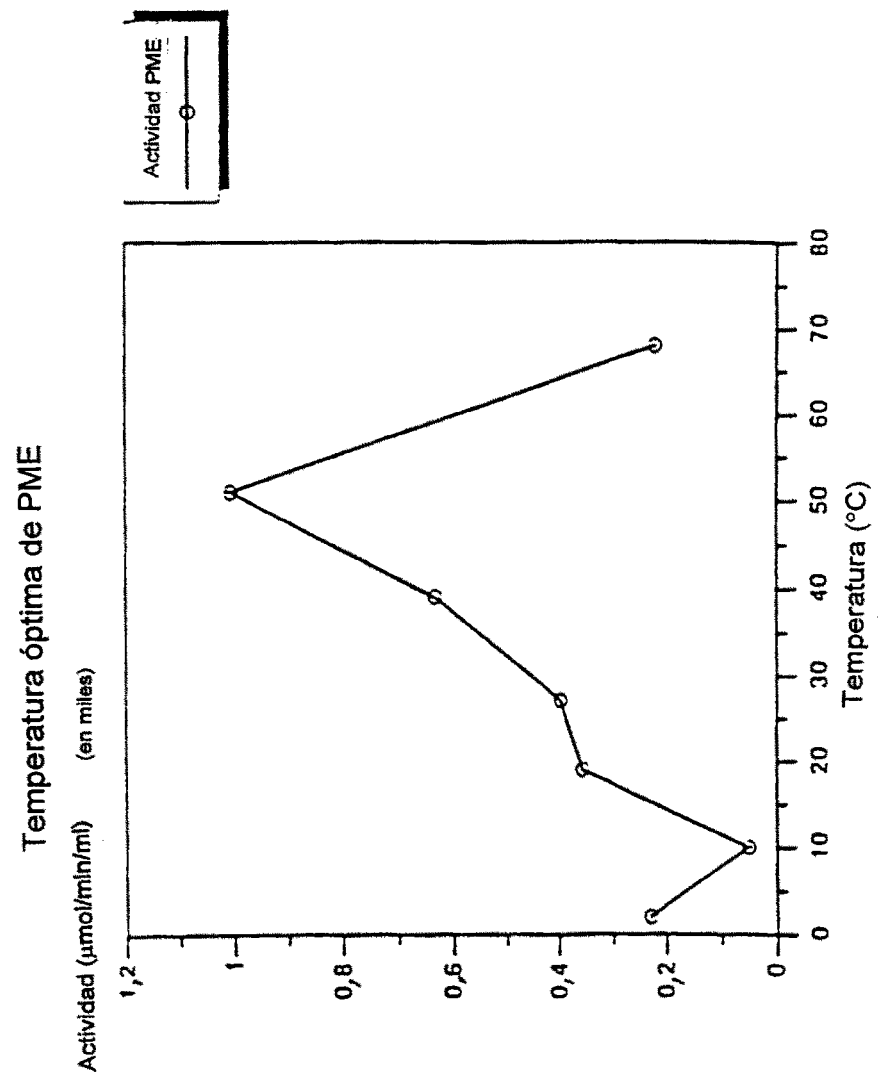


Fig. 5

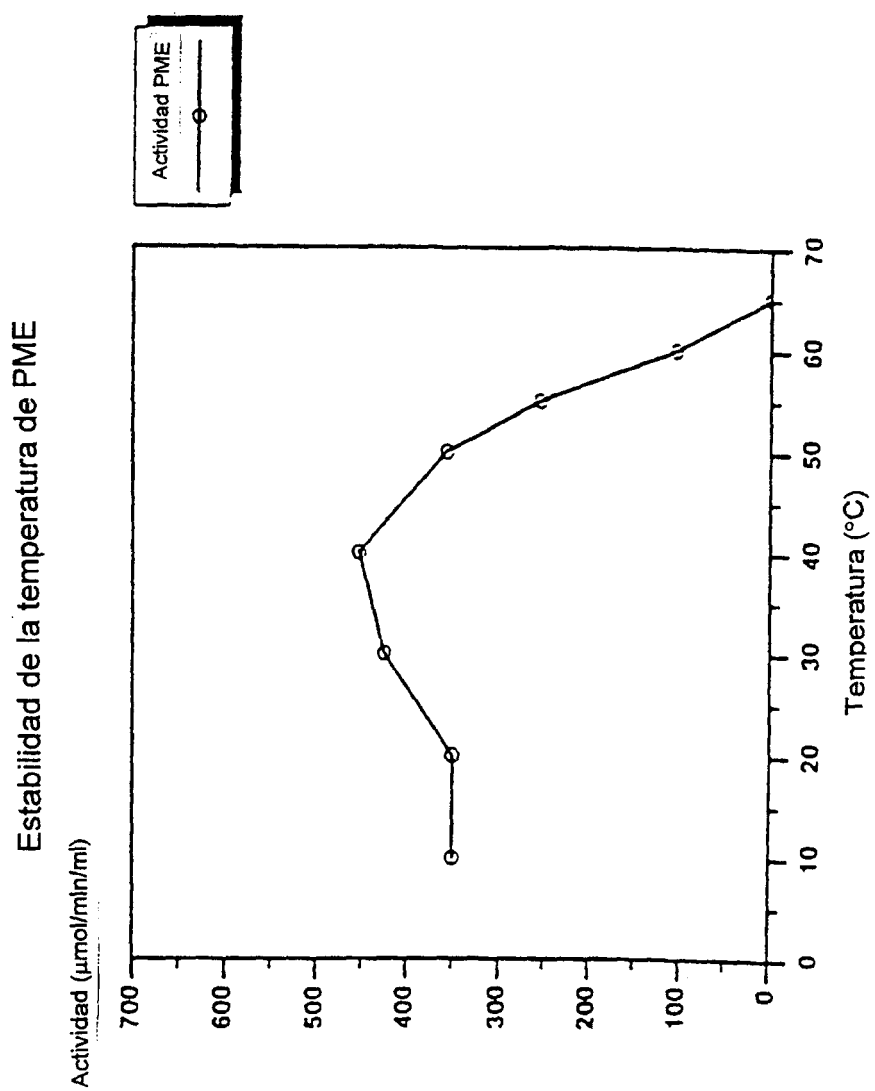


Fig. 6

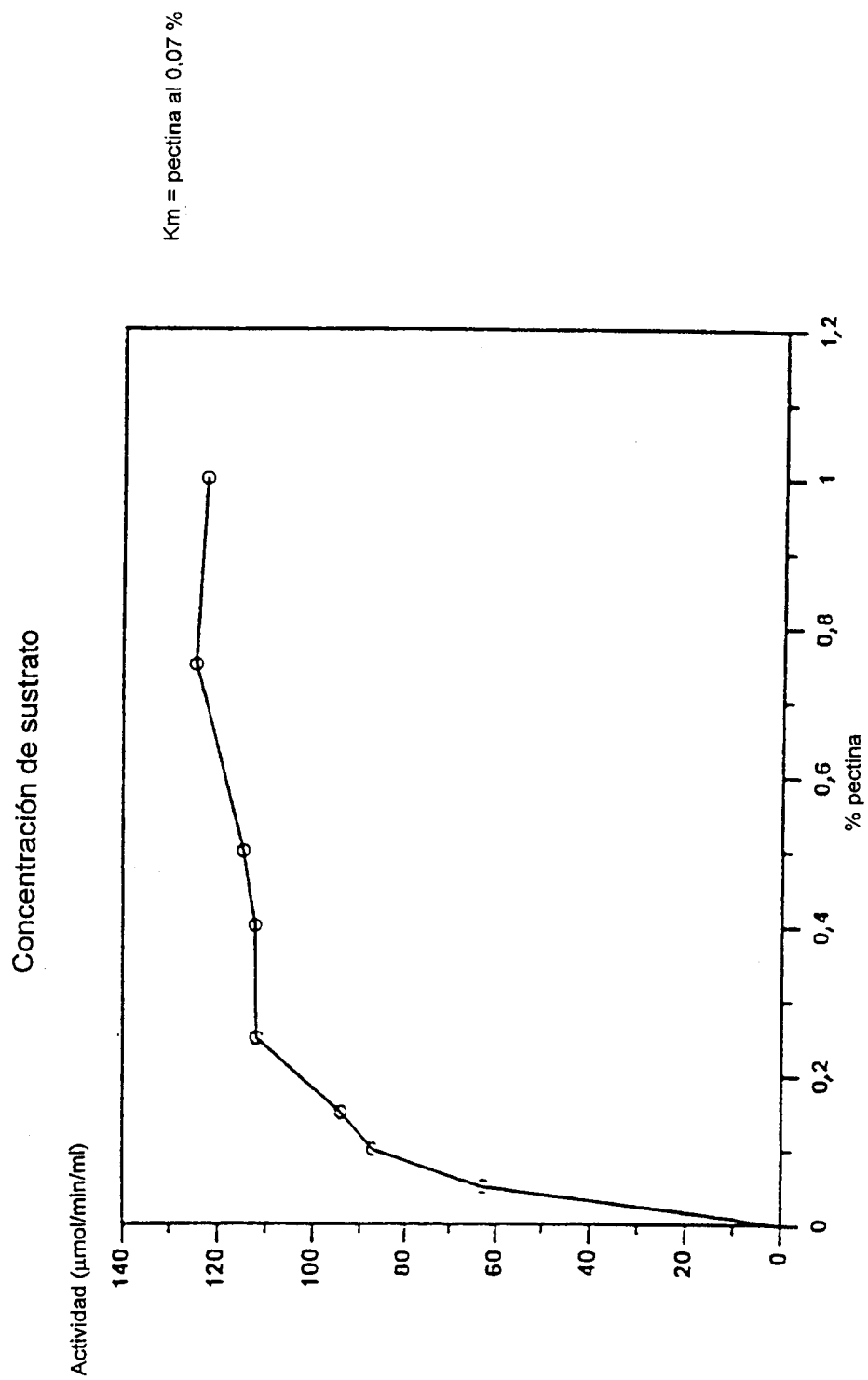


Fig. 7

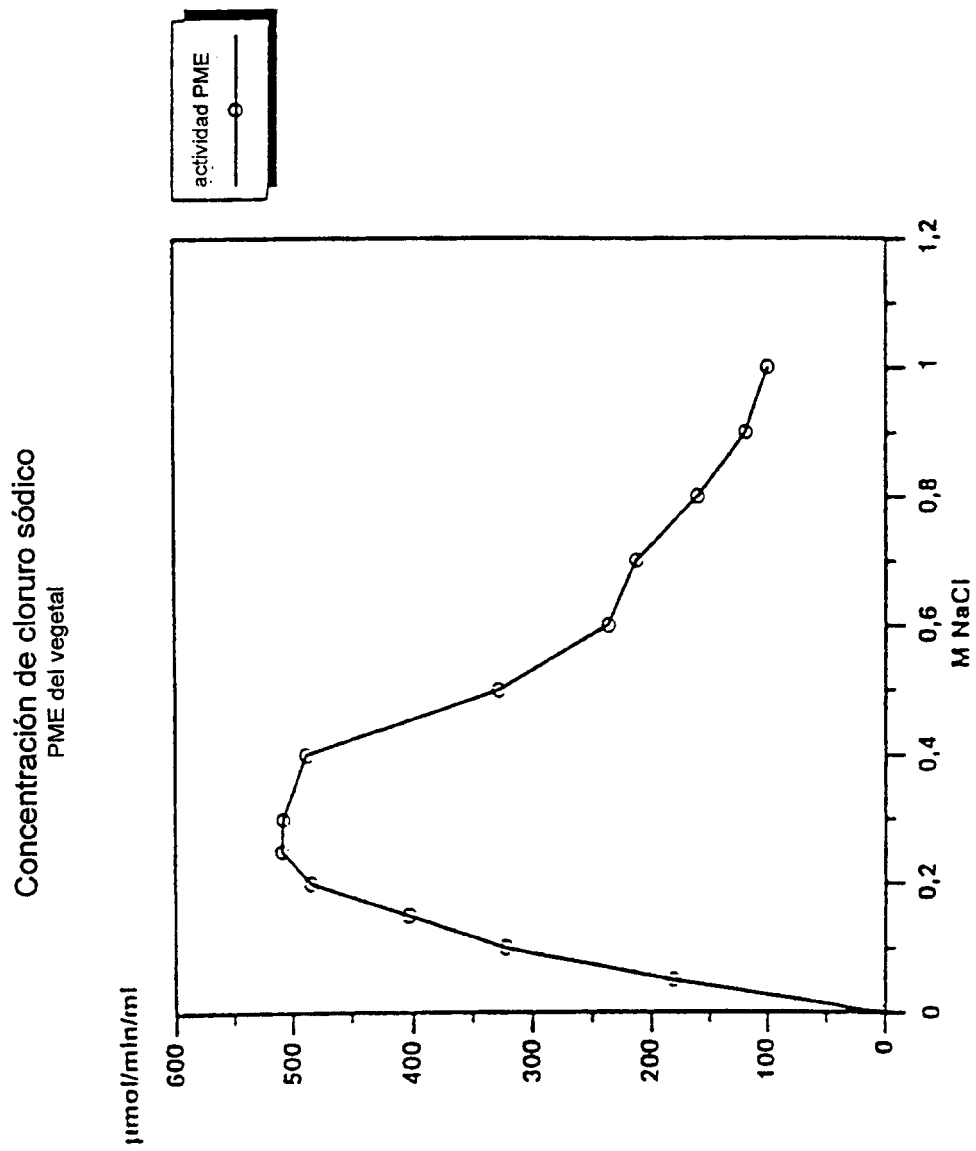


Fig. 8

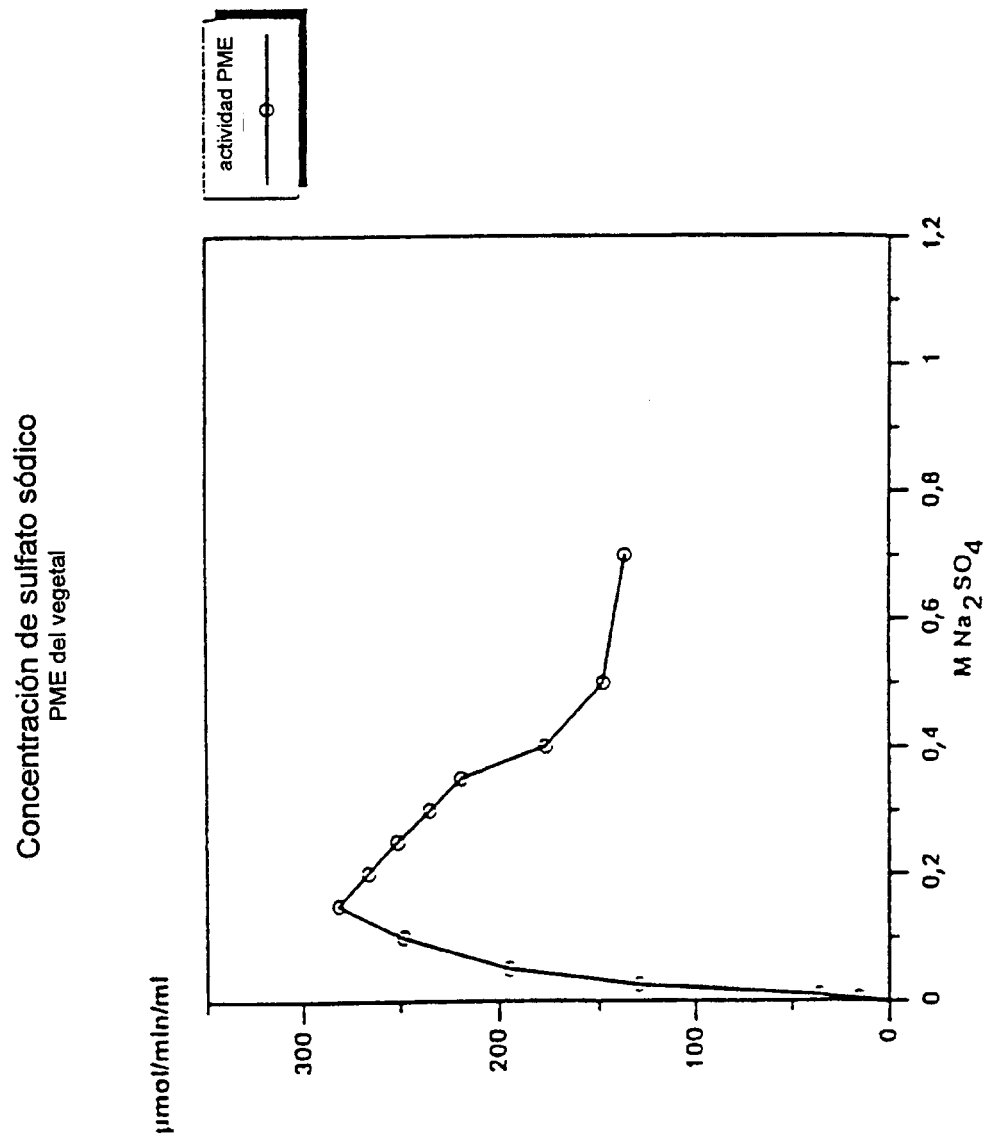


Fig. 9

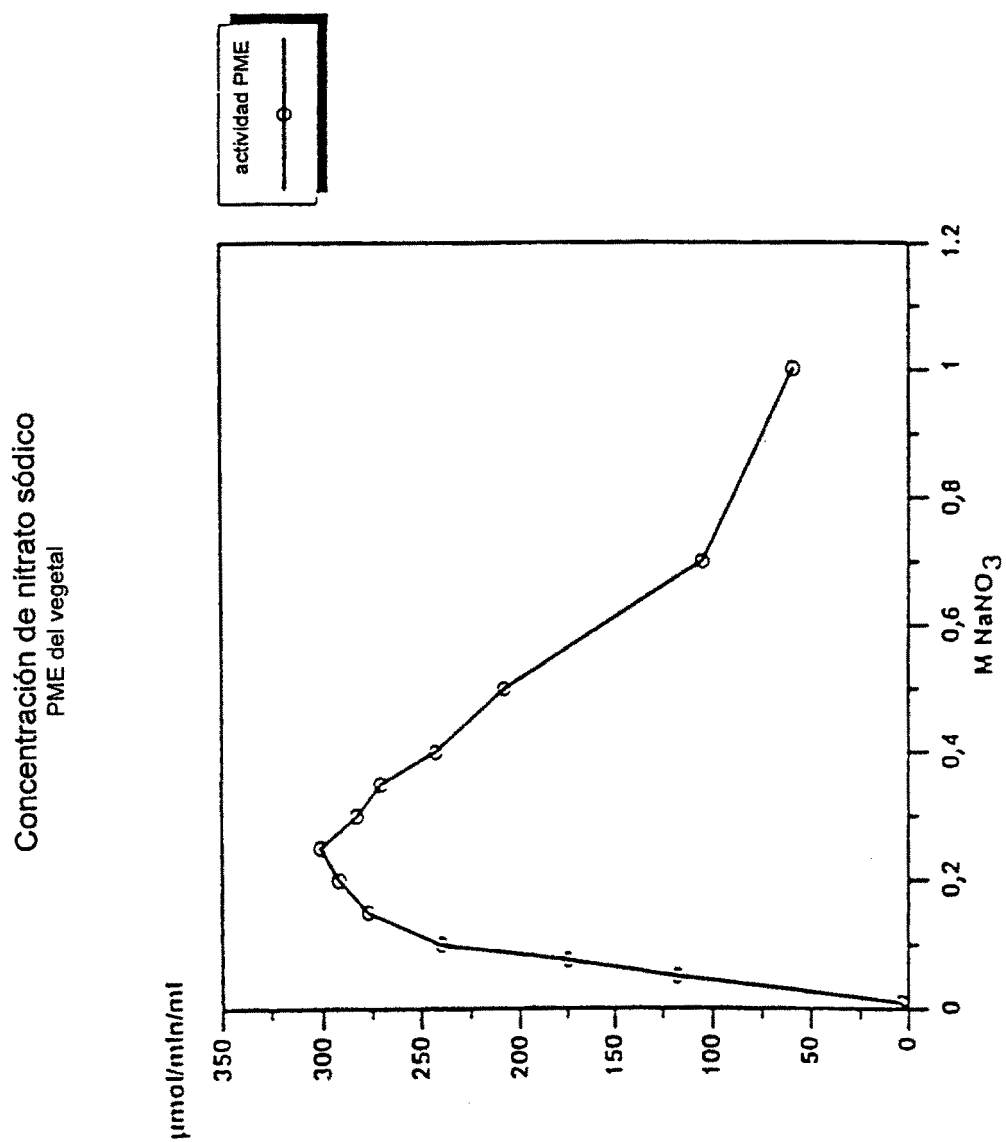


Fig. 10

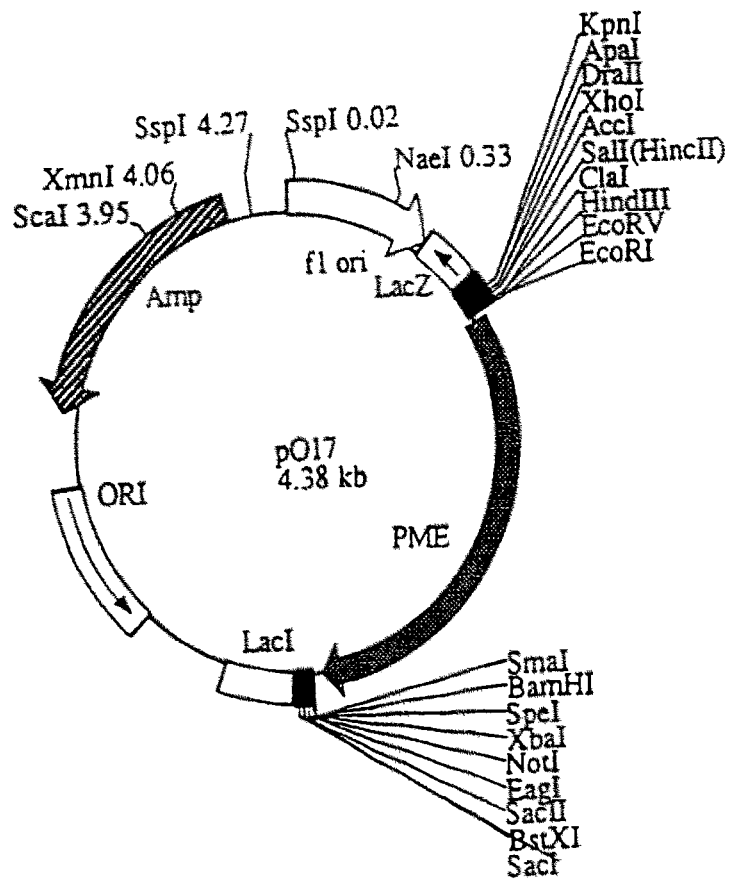


Fig. 11

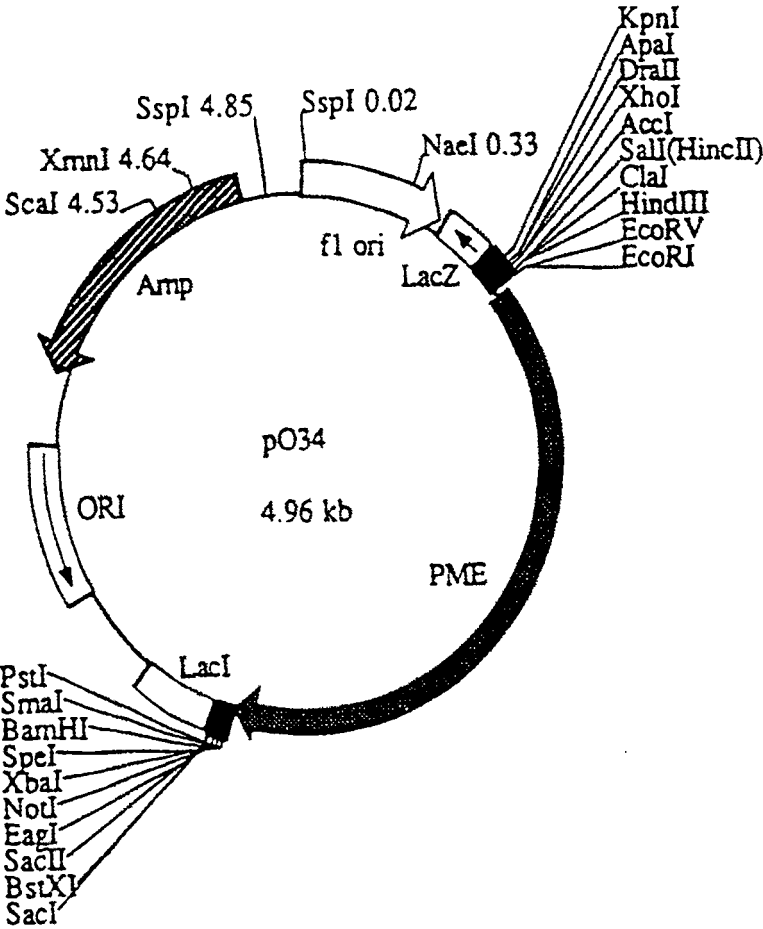
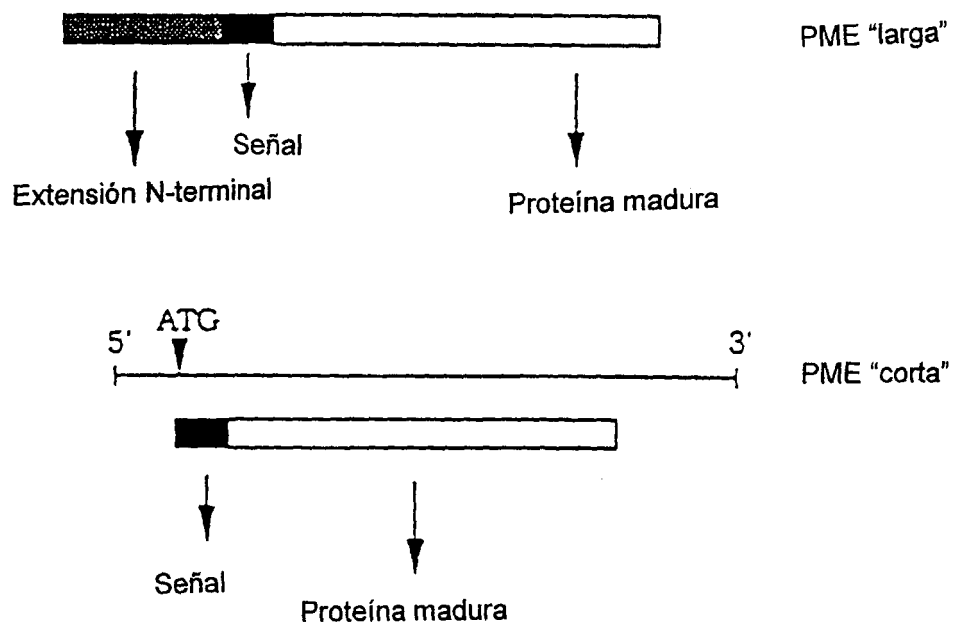


Fig. 12



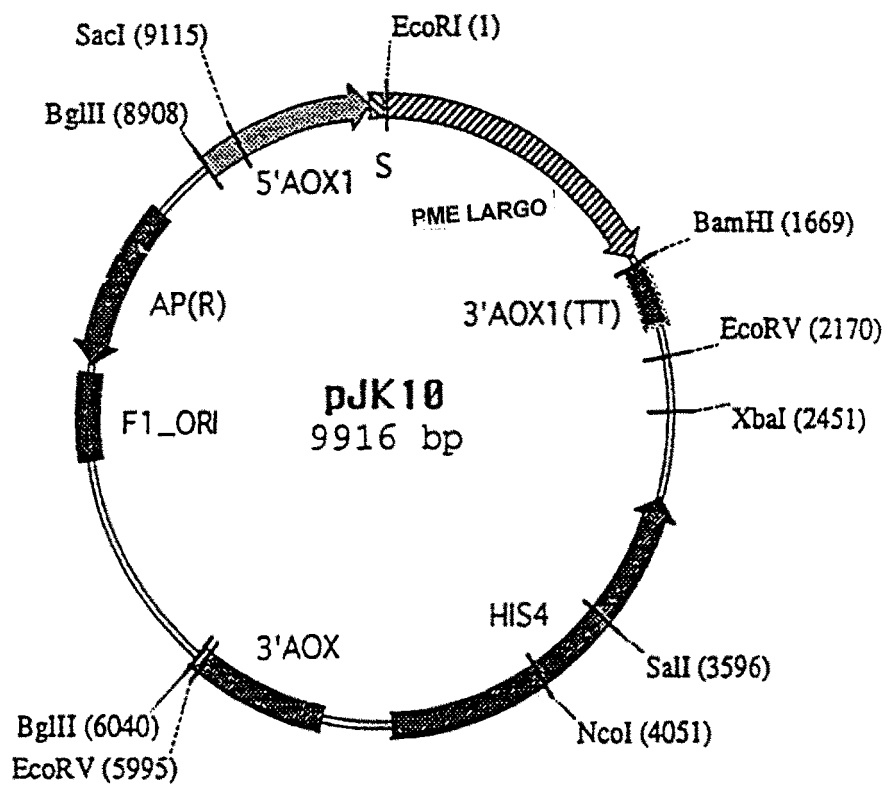


Fig. 13

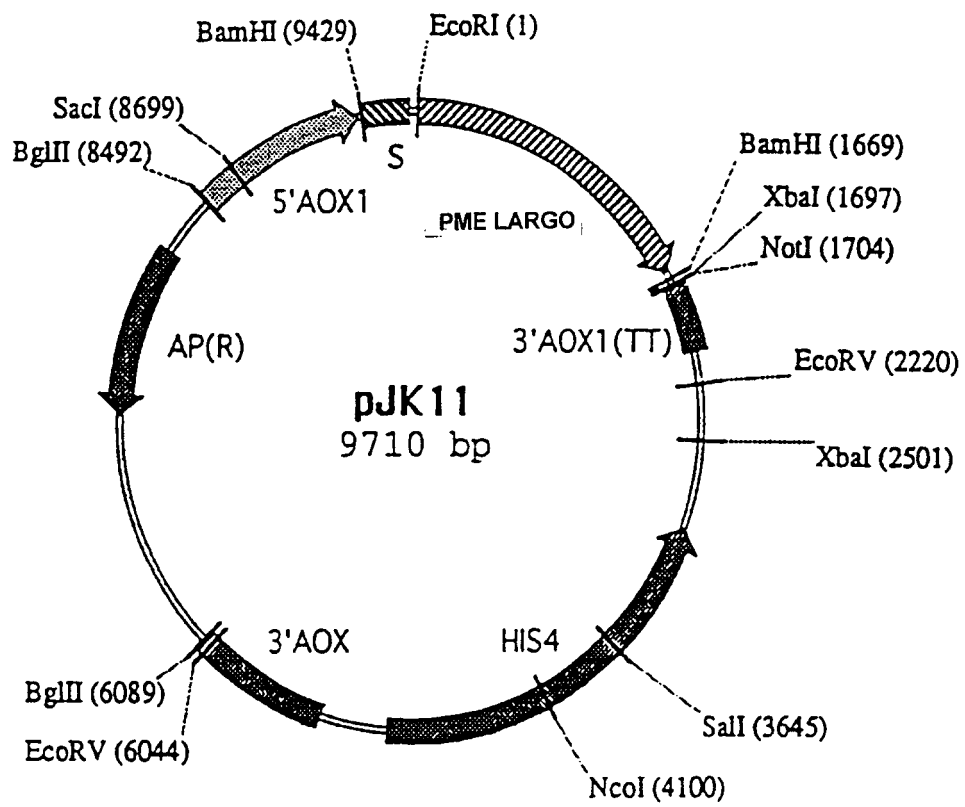


Fig. 14

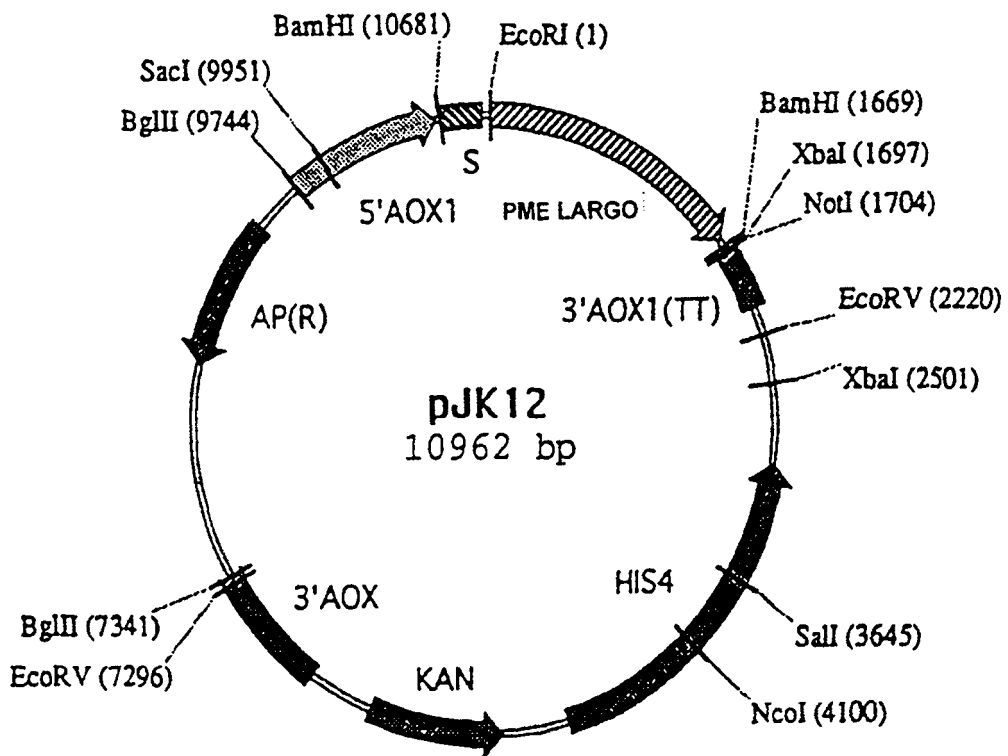


Fig. 15

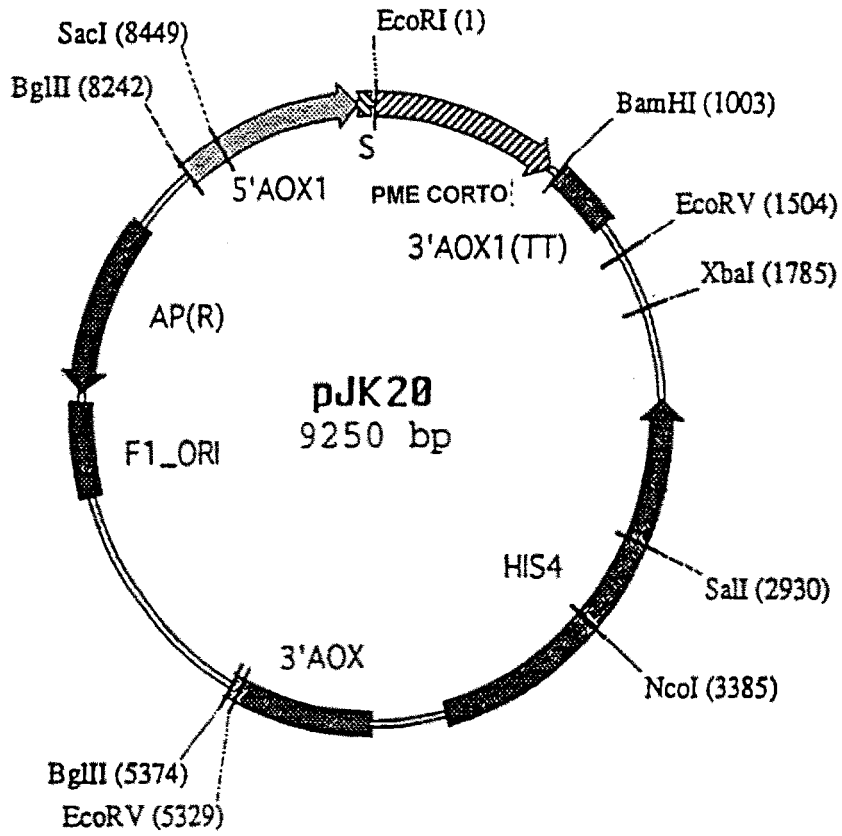


Fig. 16

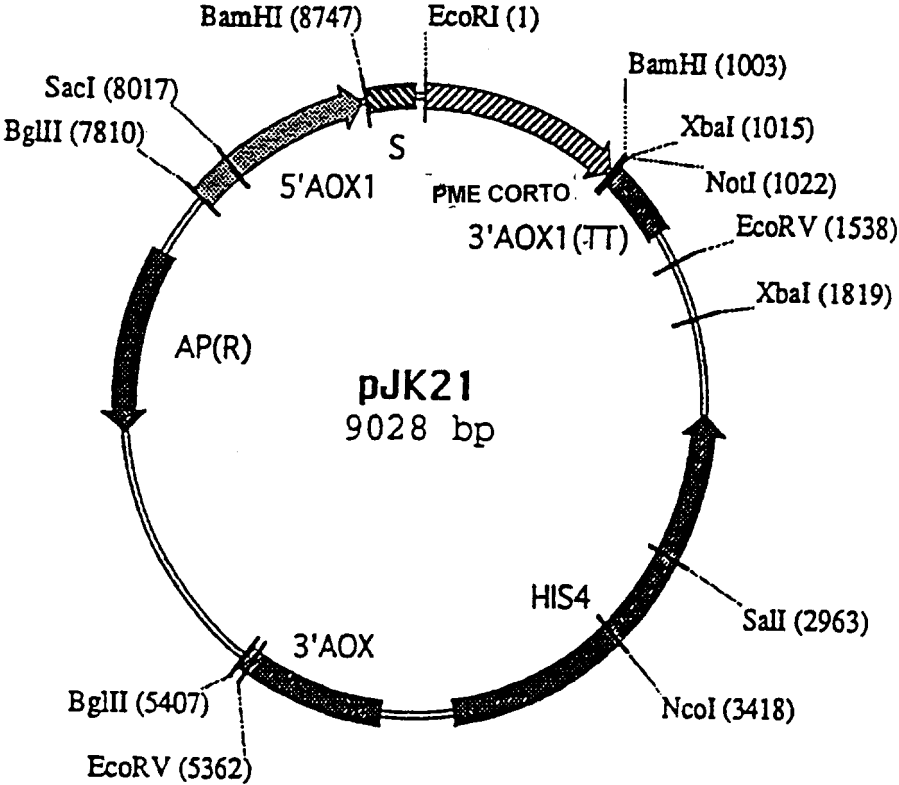


Fig. 17

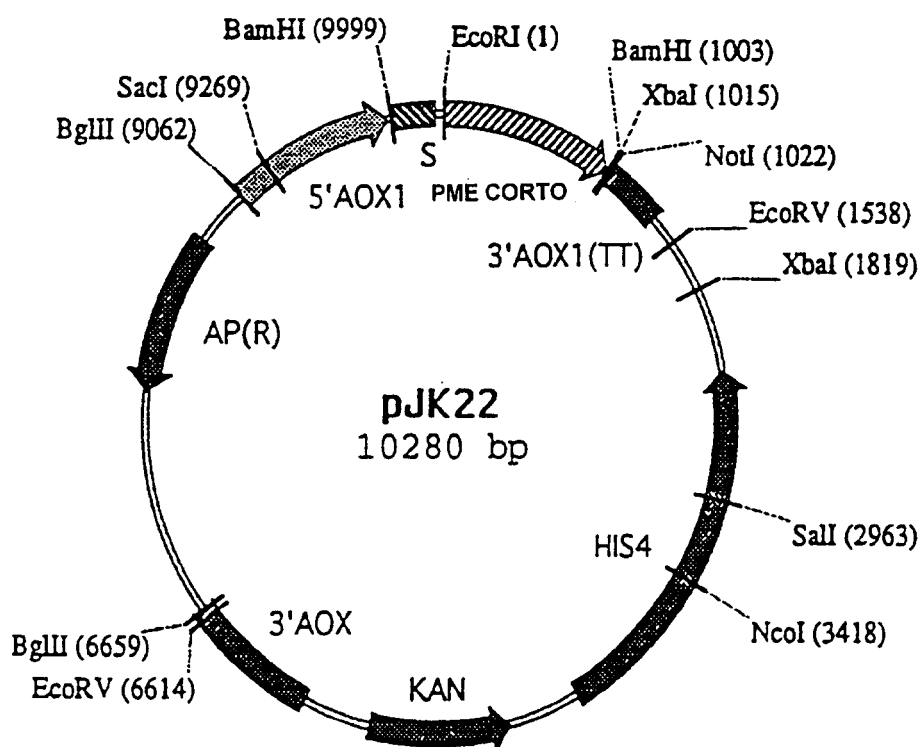


Fig. 18

ES 2 163 644 T5

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID nº 1

5					
	MIKMTDITDM	MIMRTSNRKL	LIEETSTVDG	WPAWLSTGDR	RLQSSSVTP 50
	NVVVAADGSG	NFKTVAAAVA	AAPOGGTKRY	IIRIKAGVYR	ENVEVTKKHK 100
10	NIMFIGDGRT	RTIITGSRNV	VDGSTTFKSA	TVAVVGEGL	ARDITFQNTA 150
	GPSKHQAVL	RVGADLSAFY	NCMDLAYQDT	LYVHSNRQFF	VNCLIAGTVD 200
	FIFGNAAVL	QNCDIHARKP	NSGQKNMVA	QGRADPNQNT	GIVIQSRIG 250
	ATSDLKPVQG	SFPTYLGRPW	KEYSRTVIMQ	SSITDVIHPA	GWHEWDGNFA 300
15	LNTLFYGEHQ	NAGAGAGTSG	RVKWKGRFVI	TSATEAQFT	PGSFIAGSSW 350
	LGSTGFPSL	GL			362

SEC ID nº 2

	MTRIKEFFTK	LSESSTNQNI	SNIPKKKKKL	FLALFATLLV	VAAVIGIVAG 50
	VNSRKNSGDN	GNEPHHAILK	SSCSSTRYPD	LCFSAIAAVP	EASKKVTSQK 100
25	DVIEMSLNIT	TTAVEHNYFG	IQLLKRTNL	TKREKVALHD	CLETIDETLD 150
	ELHKALEDLE	EYPNKSLSQ	HADDLKTLM	AAMTNGTCL	DGFSHDDANK 200
	HVRDALSDGQ	VHVEKMCNSA	LAMIKNMTDT	DMMIMRTSN	RKLIETSTV 250
	DGWPWLSTG	DRLLQSSSV	TPNVVVAADG	SGNFKTVAAS	VAAAPQGGTK 300
30	RYIIRIKAGV	YRENVEVTKK	HKNIMFIGDG	RRTIITGSR	NVVDGSTTFK 350
	SATVAVVGEGL	FLARDITFQN	TAGPSKHQAV	ALRVGADLSA	FYNCDMLAYQ 400
	DTLYVHSNRQ	FFVNCLIAGT	VDFIFGNAAA	VLQNCDIHAR	KPNSGQKNMV 450
	TAQGRADPNQ	NTGIVIQSR	IGATSDLKPV	QGSFPTYLGR	PWKEYSRTVI 500
35	MQSSITDVH	PAGWHEWDGN	FALNTLFYGE	HQNAGAGAGT	SGRVKWKGRF 550
	VITSATEAQA	FTPGSFIAGS	SWLGSTGPF	SLGL	584

SEC ID nº 3

	GTAGCAATGC	GCTTGCTATG	ATCAAGAACA	TGACTGACAC	TGACATGATG 50
45	ATCATGAGGA	CTTCAAACAA	CAGGAAGCTG	ATAGAGGAGA	CCAGTACGGT 100
	TGATGGGTGG	CCGGCGTGGC	TGTCCACCGG	AGACAGGAGG	CTGTTGCAGT 150
	CCTCGTCGGT	GACACCGAAC	GTGGTGGTGG	CAGCAGATGG	CAGCGGAAAC 200
	TTAAGACGG	TGGCGGCAGC	GGTGGCGGCG	GCTCCTCAGG	GAGGCACTAA 250
50	GCGGTATATT	ATTAGGATTA	AAGCCGGTGT	TTATCGGGAA	AATGTTGAGG 300
	TGACAAAGAA	GCATAAAAAT	ATAATGTTCA	TCGGTGACGG	GAGGACTAGA 350
	ACTATCATCA	CAGGAAGTAG	AAATGTGGTT	GATGGAAGCA	CAACTTCAA 400
	GTCTGCTACA	GTTGCTGTTG	TTGGTGAAGG	ATTCTTGCC	CGAGACATTA 450
55	CATTCCAAA	CACAGCCGGC	CCCTCAAAGC	ACCAGGCGGT	GGCACTACGA 500
	GTGGGAGCTG	ACCTTTCAGC	ATTTTACAAT	TGCGATATGT	TAGCTTACCA 550
	AGACACACTC	TACGTCCACT	CGAACCGCCA	GTTCTTTGTG	AACTGCTTAA 600
	TTGCTGGCAC	GGTTGATTTT	ATTTTGGTA	ACGCTGCAGC	CGTGTACAA 650
60	AATTGTGACA	TCCATGCACG	AAAGCCCAAT	TCCGCCAAA	AAAATATGGT 700
	CACAGCCCAA	GGCAGGGCTG	ACCCTAACCA	AAACACCGGC	ATTGTCATTC 750

ES 2 163 644 T5

	AAAAATCTAG GAITGGTGCC ACCTCCGATT TAAAACCGGT TCAGGGTAGT	800
	TTCCCGACGT ACCTCGGCAG GCCCTGGAAG GAGTACTCGA GGACGGTGAT	850
	CATGCAGTCA TCGATTACTG ACGTGATCCA CCCTGCCGGG TGGCACGAGT	900
5	GGGATGGTAA CTTCGCGTTG AACACATTGT TTTACGGAGA GCATCAGAAC	950
	GCCGGAGCCG GTGCCGGAAC TTCAGGGAGA GTGAAATGGA AGGGATTTAG	1000
	GGTTATTACA AGTGCTACCG AGGCTCAAGC TTTTACTCCT GGAAGCTTCA	1050
	TTGCTGGTAG TAGCTGGCTG GGCTCCACTG GTTCCCATTT CTCCTTGGT	1100
10	TTGTAATATT CACTAGGAGT TTTAATTAAT ATGTTTTGTA TTAGTGGATC	1150
	CATAGGTCTC TGGTCTTTCA ATTTGTAATA TTTGATTGAG CGTGTCTTAT	1200
	TCGTGGCTTC GATTTCAACA ATACTATTGT GTGATTAACA AGAAATAAAA	1250
	TAGCATGGGA AGAATAATAA TTTCCGGCTT CTTTAAAAAA AAAAAAAA	1300
15	AAAAAAAAAA AAAAAAAA AAA	1323

20 SEC ID n° 4

	CTTTTGTCT CTCTTATCGA GAAAAAAAT GACCCGCATA AAAGAATTCT	50
	TCACAAAAC TTCTGAATCT TCTACCAACC AAAACATTC CAATATTCCC	100
25	AAGAAAAAA AGAAACTATT CTTAGCTCTT TTTGCAACGC TACTCGTTGT	150
	CGCTGCCGTA ATCGGCATTG TCGCCGGAGT GAACTCAAGA AAAAATCCG	200
	GCGACAACGG CAACGAGCCT CATCATGCTA TCCTCAAATC ATCATGTAGC	250
	AGCACAAGGT ACCCGGACTT ATGCTTTTCG GCTATTGCTG CCGTCCAGA	300
30	GGCTCCAAA AAGGTGACAA GCCAAAAGGA CGTTATTGAG ATGTCCTTAA	350
	ACATCACAAC AACAGCCGTG GAACACAACT ACTTCGGGAT TCAGAAGCTC	400
	TTGAAGAGAA CGAATCTCAC CAAACGGGAA AAGGTGCTC TCCATGACTG	450
	TCTTGAGACG ATCGATGAGA CTCTTGATGA GTTACACAAA GCCGTCCAGG	500
35	ATCTTGAGGA GTACCCGAAC AAGAAATCTT TATCACAGCA TCGGGATGAT	550
	CTCAAACCC TAATGAGTGC CGCGATGACC AATCAGGGGA CGTGTCTTGA	600
	TGGGTCTCT CATGATGATG CTAATAAGCA CGTGCCGGAT GCGTGTGTCAG	650
	ACGGCCAGGT TCATGTTGAG AAGATGTGTA GCAATGCGCT TGCTATGATC	700
40	AAGAACATGA CTGACACTGA CATGATGATC ATGAGGACTT CAAACAACAG	750
	GAAGCTGATA GAGGAGACCA GTACGGTTGA TGGGTGGCCG GCGTGGCTGT	800
	CCACCGGAGA CAGGAGGCTG TTGCAGTCCT CGTCGGTGAC ACCGAACGTG	850
	GTGTGGCAG CAGATGGCAG CGGAACTTT AAGACGGTGG CGGCATCGGT	900
45	GGCGCGGCT CCTCAGGGAG GCACTAAGCG GTATATTATT AGGATTAAG	950
	CCGGTGTTTA TCGGGAATTT GTTGAAGTGA CAAAGAAGCA TAAAAATATA	1000
	ATGTTTCATG GTGACGGGAG GACTAGAACT ATCATCACAG GGAGTAGAAA	1050
	TGTGGTTGAT GGAAGCACAA CTTTCAAGTC TGCTACAGTT GCTGTTGTTG	1100
50	GTGAAGGATT CTTGGCCCGA GACATTACAT TCCAAAACAC AGCCGGCCCC	1150
	TCAAAGCAC AGGCGGTGSC ACTACGAGTG GGAGCTGACC TTTCAGCATT	1200
	TTACAATTGC GATATGTTAG CTTACCAAGA CACACTCTAC GTCCACTCGA	1250
	ACCGCCAGTT CTTTGTGAAC TGCTTAATTG CTGGCACGGT TGATTTTATT	1300
55	TTTGGTAACG CTGCAGCCGT GTTACAAAAT TGTGACATCC ATGCACGAAA	1350
	GCCCAATTCC GGCCAAAAAA ATATGGTCAC AGCCCAAGGC AGGGCTGACC	1400
	CTAACCAAAA CACCGGCATT GTCAATCAAA AATCTAGGAT TGGTGCCACC	1450
	TCCGATTTAA AACCGGTTCA GGGTAGTTTC CCGACGTACC TCGGCAGGCC	1500
60	CTGGAAGGAG TACTCGAGGA CCGTGATCAT GCAGTCATCG ATTACTGACG	1550
	TGATCCACCC TGCCGGGTGG CACGAGTGGG ATGGTAACTT CGCGTTGAAC	1600
	ACATTGTTTT ACGGAGAGCA TCAGAACGCC GGAGCCGGTG CCGGAACCTC	1650
	AGGGAGAGTT AAATGGAAGG GATTAGGGT TATTACAAGT GCTACCGAGG	1700
65	CTCAAGCTTT TACTCCTGGA AGCTTCATTG CTGGTAGTAG CTGGCTGGGC	1750

ES 2 163 644 T5

TCCACTGGTT TCCCATTCTC CCTTGGTTTG TAATATTCAC TAGGAGTTTT 1800
 AATTAATATG TTTTGTATTA GTGGATCCAT AGGTCTCTGG TCTTTCAATT 1850
 TGTAATATTT GATTGAGCGT GTCTTATTCG TGGCTTCGAT TTCACAAATA 1900
 5 CTATTGTGTG ATTAACAAGA AATAAAATAG CATGGGAAGA ATAATAATT 1950
 CCGGCTTCTT TAAATTAATA AAAAA 1975

10 SEC ID n° 5

IVAGVNSRKN SGDNGNEPHH AILKSSCSST RYPDLCFSAI AAVPEASKKV 50
 TSQKDVIEWS LNITTTAVEH NYFGIQKLLK RTNLTREKV ALHDCLETID 100
 15 ETLDELHKAV EDLEEYPNKK SLSQHADDLK TLMSAAMTNQ GTCLDGFSDH 150
 DANKHVRDAL SDGQVHVEKM CSNALAMIKN MTDTDMMIMR TSNNRKLIIE 200
 TSTVDGWPAW LSTGDRRLQ 220

20

SEC ID n° 6

ATTGTCGCCG GAGTGAAGTC AAGAAAAAC TCCGGCGACA ACGGCAACGA 50
 GCCTCATCAT GCTATCCTCA AATCATCATG TAGCAGCACA AGGTACCCGG 100
 ACTTATGCTT TTCGGCTATT GCTGCCGTTT CAGAGGCCTC CAAAAAGGTG 150
 ACAAGCCAAA AGGACGTTAT TGAGATGTCC TAAACATCA CAACAACAGC 200
 30 CGTGGAACAC AACTACTTCC GGATTCAGAA GCTCTTGAAG AGAACGAATC 250
 TCACCAAACG GAAAAGGTT GCTCTCCATG ACTGTCTTGA GACGATCGAT 300
 GAGACTCTTG ATGAGTTACA CAAAGCCGTC GAGGATCTTG AGGAGTACCC 350
 GAACAAGAAA TCTTTATCAC AGCATGCGGA TGATCTCAA ACCCTAATGA 400
 GTGCCGCGAT GACCAATCAG GGGACGTGTC TTGATGGGTT CTCTCATGAT 450
 35 GATGCTAATA AGCACGTGCG GGATGCGTTG TCAGACGGCC AGGTTTCATGT 500
 TGAGAAGATG TGTAGCAATG CGCTTGCTAT GATCAAGAAC ATGACTGACA 550
 CTGACATGAT GATCATGAGG ACTTCAAACA ACAGGAAGCT GATAGAGGAG 600
 40 ACCAGTACGG TTGATGGGTT GCCGGCGTGG CTGTCCACCG GAGACAGGAG 650
 GCTGTTGCAG 660

45 SEC ID n° 7

PE511 (14 aa) Ser-ala-thr-val-ala-val-val-gly-glu-gly-phe-leu-ala-arg

50

SEC ID n° 8

55 PE3252 (4 aa) Tyr-ile-ile-arg

60 SEC ID n° 9

PE8 (8 aa) Asn-ile-met-phe-ile-gly-dsp-gly

65

ES 2 163 644 T5

SEC ID n° 10

5

PE21 (21 aa)

**Ile-gly-ala-thr-ser-asp-leu-lys-pro-val-gln-gly-ser-
phe-pro-thr-tyr-leu-gly-arg-pro**

10 SEC ID n° 11

15 PE492D (15 aa)

**xxx-ser-ala-thr-val-ala-val-val-gly-glu-gly-phe-leu-
ala-arg**

SEC ID n° 12

20

PE492C (11 aa)

xxx-ala-tyr-pro-gly-gln-ile-thr-ser-asn-met

25

SEC ID n° 13

30 PE492B (12 aa)

Asn-cys-asp-met-leu-ala-tyr-gln-asp-thr-leu-tyr

SEC ID n° 14

35

40 PE492A (16 aa)

**Val-ile-thr-ser-ala-thr-glu-ala-gln-ala-phe-thr-pro-
gly-ser-phe**

45

SEC ID n° 15

50

55 PE701 (28 aa)

**Val-ile-thr-ser-ala-thr-glu-ala-gln-ala-phe-thr-pro-
gly-ser-phe-ile-ala-gly-ser-ser-trp-leu-gly-ser-thr-
gly-phe**

60

SEC ID n° 16

65

PES94 (13 aa)

Ile-ala-gly-ser-ser-trp-leu-gly-ser-thr-gly-phe-pro

60

SEC ID n° 17

65

PE7 (19 aa)

**Asn-met-val-thr-ala-gln-gly-arg-ala-asp-pro-asn-gln-
asn-thr-gly-ile-val-ile**

ES 2 163 644 T5

SEC ID nº 18

5

PE251 (38 aa)

~~xxx-arg-ile-gly-ala-thr-ser-asp-leu-lys-pro-val-gln-gly-ser-phe-pro-thr-tyr-leu-gly-arg-pro-(trp)-lys-glu-tyr-(ser)-arg-(thr)-val-ile-met-gln-ser-ser-ile-thr~~

10

SEC ID nº 19

15

PE201 (27 aa)

~~xxx-xxx-ile-gly-ala-thr-ser-asp-leu-lys-pro-val-gln-gly-ser-phe-pro-thr-tyr-leu-gly-arg-pro-xxx-lys-glu-tyr~~

20

SEC ID nº 20

25

PE 22 (21 aa)

~~Ser-arg-ile-gly-ala-thr-ser-asp-leu-lys-pro-val-gln-gly-ser-phe-pro-thr-tyr-leu-gly~~

30

aa 2 (arg) podrá ser reemplazado por val

aa 3 (ile) podrá ser reemplazado por met

35

aa 6 (thr) podrá ser reemplazado por val

40

45

50

55

60

65