



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HF

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-223686-00000-0000

Fecha: 2015-09-21 17:30:00 Dep. 2020 DIR NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 35

DELEGATURA DE PROPIEDAD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-083396-00004-0000

División de Nuevas Creaciones

Fecha: 2015-09-21 17:30:00 Dep. 2020 DIR NUEVASCF
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 35

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO METODO DE OBTENCION DE 1-KESTOSA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

DOMICILIO La Habana, Cuba

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

CAVELIER ABOGADOS



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-223686- -00000-0000

E Fecha: 2015-09-21 17:30:00 Dep: 2020 DIR NUEVASCF
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 35

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-083396- -00004-0000

Fecha: 2015-09-21 17:30:00 Dep: 2020 DIR NUEVASCF
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 851 DIVISIONAL Folios: 35

DIRECCIÓN DE NUEVAS (CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN)

1. Identificación del Trámite

- Conversión
 División
 Fusión
- Patente de Invención
 Patente de Modelo de Utilidad
 Registro de Diseño Industrial
 Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural
 Persona Jurídica

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa: Micro Pequeña Mediana Otra

Documento de identificación: C.C. C.E. NIT Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Cuba	Avenida 31 entre 158 y 190, Playa La Habana 11600, Cuba	La Habana
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre: De Fález Luz Clemencia
 Documento de identificación: C.C. 35.456.344
 Tarjeta profesional: T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 4ª No. 72 -35	Bogotá	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general		

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

DIVISION

Expediente 15.083.096
De: 15 083 396
A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____
A: _____5. Comprobante de pago No. 15-102275

Fecha : 2015/09/17

6. Anexos

- Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$478.000.
- Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por
- Poder de **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA**
- Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

Nombre y apellidos

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 DE Usaquén

Firma

Tarjeta Profesional 23.555

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. **15.083.396**. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. **5311** notificado por fijación en lista del 19 de mayo de 2015. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 15 de abril de 2015 y la prioridad que allí se reivindica el 18 de septiembre de 2012.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. **15.083.396**

METODO DE OBTENCION DE 1-KESTOSA

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con la rama alimenticia y la industria azucarera, en particular con la obtención de fructooligosacáridos (FOS) a partir de la sacarosa u otras materias primas que la contengan, como mieles, meladura, siropes, etc.

Estado de la técnica anterior

Los FOS están compuestos por cadenas lineales con 1-9 residuos de fructosa enlazados a una molécula de sacarosa por enlace β 2 \rightarrow 1 (Yun., 1996; *Enzyme Microb. Technol.* 19:107-117). La importancia de estos compuestos radica en que pueden utilizarse como ingredientes no digeribles de la dieta, tanto de humanos como de animales, brindando un efecto prebiótico, al producir efectos beneficiosos mediante la estimulación selectiva del crecimiento o la actividad de uno o más tipos de microorganismos en el colon. Entre dichos microorganismos se encuentran Lactobacillus y Bifidobacterias (Gibson y Roberfroid., 1995; *J. Nutr.* 125 (6): 1401-12). En la naturaleza, los FOS son producidos por acción de enzimas tipo fructosiltransferasas (FTF, EC 2.4.1.9) y β -fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26) de plantas, hongos, bacterias y algunas levaduras (Guío y cols., 2009; *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture.* 1(3): 221-30).

La producción industrial de FOS, actualmente, se realiza siguiendo dos estrategias: degradación parcial de inulinas (Yun., 1996; *Enzyme Microb. Technol.* 19:107-117; Franck., 2002; *British Journal of Nutrition* 87 (2): S287-S291) o síntesis enzimática a partir de la sacarosa, con empleo de enzimas β -fructofuranosidasa con alta actividad transfructosilasa o FTF, producidas fundamentalmente por hongos (*Aspergillus niger*, *A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. aculeatus* y *Aureobasidium pullulans*) (Yun., 1996; *Enzyme Microb. Technol.* 19:107-117; Vaňková y cols., 2008; *Chemical Papers* 62 (4) 375-381). Ambas tecnologías dan lugar a una mezcla de FOS, que varía su grado de polimerización (GP) de 2 a 10, cuyos principales componentes son: 1-kestosa (GF₂), nistosa (GF₃), fructosilnistosa (GF₄), bifurcosa (GF₃), inulobiosa (F₂), inulotriosa (F₃) e inulotetraosa (F₄). La 1-kestosa es el FOS de mayor interés comercial, por su doble efecto de edulcorante hipocalórico y prebiótico, así como por su posible uso como azúcar para diabéticos (Vega y Zúñiga-Hansen., 2011; *Bioresource Technology* 102 (22), 10180-10186).

Las tecnologías y los documentos de patentes de producción de FOS, por biotransformación de la sacarosa, se basan en el empleo de células y enzimas (inmovilizadas o libres), de microorganismos salvajes tales como: *Aureobasidium pullulans* (Smith y Luenser, 1980. Patente US4309505), *A. phoenicis* (Van Dooren y cols., 1988. Patente US4849356), *A. niger* (Hidaka, H. y col., 1988, *Agric. Biol. Chem.*

1181), *A. aculeatus* (Fernandez-Arrojo y cols., 2009. Solicitud de Patente WO 2010/103150 A1), la levadura *Rhodotorula sp.* (Aguiar de Oliveira y cols., 2007. Solicitud de patente BRPI0705359-2 A2), y las bacterias *Microbacterium laevaniformans* (Hatcher y cols., 1988. Patente US4927757), *Rahnella aquatilis* (Ohtsuka, K. y cols. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(9), 1373-1377, 1992), *Zymomonas mobilis* (Hatcher y cols., 1988. Patente US4797360), etc. Estos procesos de producción se realizan en diferentes tipos de reactores, fundamentalmente del tipo tanque agitado y lecho fijo, operando ya sea de forma discontinua o continua. Los procesos discontinuos utilizados hasta la fecha tienen como limitante que la acumulación de glucosa liberada inhibe la reacción de síntesis. Por otra parte, los procesos continuos, que emplean enzimas o células inmovilizadas en diferentes soportes, disminuyen los costos del proceso de producción, por re-uso del biocatalizador, y también reducen los efectos de inhibición de la glucosa. Sin embargo, dichos procesos continuos tienen como limitante que no pueden operar a altos flujos, debido a las limitantes de difusión y acceso a los sustratos. Los tiempos de reacción se ajustan para evitar la actividad hidrolítica, dichos tiempos dependen de la cantidad inicial de actividad enzimática por gramo de sustrato, y varían entre 8 y 24 horas, en las que se sintetiza una mezcla de 1-kestosa, nistosa y fructosilnistosa.

La obtención de 1-kestosa con más de un 90% de pureza, o en forma de cristales (Tetsuhiro y cols., 1995. Patente US5463038; Koichiro y cols., 2010. Solicitud de Patente JP2010273580-A), a partir de mezclas de productos de reacción cuya composición en carbohidratos es aproximadamente de 20-25% de glucosa, 10-15% de sacarosa, 5% de fructosa y 55-60% de FOS totales; y de estos últimos en concentraciones de 1-kestosa que pueden variar entre 40 y 60%, es un proceso extremadamente complejo, inviable desde el punto de vista técnico- económico para su uso en alimentos. La separación cromatográfica de la 1-kestosa es solo viable, desde el punto de vista técnico- económico, cuando su concentración es superior al 80% de los FOS totales en la mezcla (Nishizawa y cols., 1996. Patente US6479657).

La obtención de mezclas de reacción cuyo contenido de FOS sea mayoritariamente 1-kestosa (más del 80% de los azúcares de la mezcla) es poco frecuente. La 1-kestosa ha sido sintetizada en altos niveles por enzimas provenientes de algunos hongos, tales como *A. aculeatus* (Hang y Woodams., 1995; *Biotechnology Letters* 17: 295-298) y *A. japonicus* ATCC 20236, a expensas de utilizar concentraciones de sacarosa inferiores a 227 g/L (Mussatto y cols., 2009; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59: 76–81). En ambos informes la 1-kestosa representó aproximadamente el 71% de los FOS totales presentes en la mezcla, pero cuando fueron ensayadas concentraciones de sacarosa superiores a 500 g/L el porcentaje de 1-kestosa disminuyó a valores cercanos o inferiores al 60% (Ghazi y cols., 2005; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*

35: 19–27). Las enzimas β -fructofuranosidasas de *A. niger* ATCC 20611, *Penicillium roqueforti* y *Scopulariopsis brevicaulis*, son capaces de producir 1-kestosa en un 76,7%; 86,7% y 91,3%, respectivamente, a concentraciones de 500 g/L de sacarosa (Nishizawa y cols., 2002. Patente US6479657 B1). Aunque estas cifras muestran que las enzimas de *P. roqueforti* y *S. brevicaulis* son superiores a la de *A. niger*, en cuanto a rendimiento de 1-kestosa, no lo son en términos de productividad y estabilidad. Además, ambos microorganismos no son reconocidos como seguros (GRAS o QPS, del inglés *General Recognized as Safe or Qualified Presumption of Safety*) para la aplicación en alimentos (EFSA Panel on Biological Hazards., 2009; EFSA Journal 7(12):1431; Cuenca-Estrella y cols., 2003; *Antimicrob Agents Chemother* 47(7): 2339–2341).

El empleo de hongos filamentosos en fermentaciones industriales constituye otra gran limitación productiva, pues los filamentos se enrollan en los impelentes de los agitadores, dañando sus aspas, y frecuentemente dichos filamentos son propensos a bloquear los difusores de aire del fermentador (Ahmad y cols., 2010; *Bioprocess Biosyst Eng.* 33, 599–606).

Estudios de identidad de secuencia de aminoácidos entre diferentes β -fructofuranosidasas sirvieron como herramienta para obtener una versión mutada de la enzima de *A. niger*. Al expresar el gen codificante para esta enzima mutada, en una cepa del mismo hongo carente de actividad β -fructofuranosidasa, se obtuvo que el 93,5% de los FOS totales correspondió a la 1-kestosa, cuando la enzima reacciona a una concentración de sacarosa de 550 g/L (Nakamura y cols., 2010. Patente US7655449).

Sin embargo, no se han encontrado sistemas productivos de FTFs tecnológicamente viables que permitan la disponibilidad comercial de dichas enzimas, para la producción industrial de FOS, mucho menos para producir específicamente 1-kestosa (Vega y Zúñiga-Hansen., 2011; *Bioresource Technology* 102 (22), 10180-10186). El cultivo de hongos, y la posterior extracción y/o purificación de la FTF endógena, constituye la principal limitante, por lo que se necesita investigar el empleo de otros hospederos.

Como resultado de investigaciones básicas, encaminadas a revelar y describir el mecanismo de síntesis de fructanos en plantas, se han publicado trabajos relacionados con el aislamiento de genes que codifican para enzimas FTF, que actúan sobre la sacarosa como sustrato. Dichos genes provienen de diferentes especies de planta, tales como: *Cichorium intybus* (De Halleux y van Cutsem., 1997; *Plant Physiol* 113: 1003-), *Hordeum vulgare* (Hochstrasser y cols., 1998; *FEBS Letters* 440: 356-360), *Helianthus tuberosus* (Van der Meer y cols., 1998; *Plant J. Aug* 15 (4):489-500), *Festuca arundinacea* (Luscher y cols., 2000; *Plant Physiology* 124 (3):1217–1227, *Agave tequilana* (Avila-Fernandez y cols., 2007; *Plant Science* 173: 478–486), *Allium*

cepa (Gadegaard y cols., 2008; *J. Plant Physiol.* 165:1214-1225), *Lolium perenne* (Lasseur y cols., 2009; *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2719-2734) y *Triticum aestivum* (Schroeven y cols., 2008; *New Phytol* 180:822–831). Varios de estos genes nativos, combinados formando enzimas híbridas por intercambios de dominios catalíticos, o con mutaciones puntuales, han sido expresados en *Pichia pastoris* para estudios básicos (no con fines productivos), relacionados con filogenia, funcionalidad enzimática, y caracterización molecular (Altenbach y cols., 2004; *FEBS Letters* 567: 214-218). En todos estos estudios, que se han realizado a nivel de laboratorio, se utilizó el promotor de regulación transcripcional de la enzima alcohol oxidasa I (*pAOXI*). Este promotor, inducible con metanol, no es aceptado en muchos procesos industriales a gran escala, por la gran cantidad de metanol a utilizar, teniendo en cuenta su volatilidad y carácter inflamable. Además, el uso de este alcohol está prohibido en el procesamiento de alimentos o sus ingredientes. En algunos de los trabajos se comprobó la especificidad de las enzimas sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST (SEQ ID NO. 1)) en la síntesis de 1-kestosa, pero solo a concentraciones relativamente bajas de sacarosa; entre 0,1-0,15 M (34,2 - 51,3 g/L). Además, se observó que estas enzimas tipo 1-SST (SEQ ID NO. 1) son capaces de utilizar la 1-kestosa como sustrato (Luscher y cols., 2000; *Plant Physiology* 124 (3):1217–1227; Avila-Fernández y cols., 2007; *Plant Science* 173: 478–486). En los trabajos referidos, unido a la limitación práctica del uso del promotor *pAOXI* para procesos a gran escala que involucren productos alimenticios, no se encontraron tampoco niveles de expresión, ni de estabilidad térmica, que sugieran o sienten las bases para el uso de este tipo de enzimas de origen vegetal en la producción industrial de FOS.

Por tanto, en la producción industrial de 1-kestosa, no se ha utilizado nunca una enzima recombinante aislada a partir de una fuente vegetal. A escala industrial, solo se han utilizado los jugos de las plantas *Cichorium intybus* y *Polymnia sonchifolia*, compuestos por una mezcla de FOS de diferentes GP, donde la 1-kestosa no es mayoritaria (Guío y cols., 2009, *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* Vol. 1 No. 3). Factores como el bajo rendimiento, la poca secreción al medio extracelular, y la degradación por proteasas durante su expresión mediante la tecnología del ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante, unido a la inestabilidad propia de la enzima en cuestión, han inclinado la balanza a favor del uso de los hongos, o las enzimas FTF producidas por ellos, en la producción industrial de FOS.

Si escasos o nulos son los informes en la literatura sobre el empleo de enzimas de origen vegetal para producir 1-kestosa industrialmente, tampoco los biorreactores de membrana (BRM) se han utilizado con este fin. Hasta la fecha, esta tecnología se emplea con éxito para el reciclaje del agua en los edificios, tratamiento de aguas

residuales para pequeñas comunidades, tratamiento de residuales industriales, tratamiento de lixiviados de vertedero, etc. (Judd S., 2008; *TRENDS in Biotechnology* 25(2):109 -116). Sólo dos reportes reflejan el uso de BRM de contacto directo para la producción de FOS. Uno de ellos utiliza membranas para separar el microorganismo de la mezcla de reacción que contiene FOS, donde la 1-kestosa no es el producto mayoritario (Sánchez y cols., 2008; *Food and bioproducts processing* 86, 109–115). Un biorreactor similar se utilizó para remover, a través de una membrana de nanofiltración, la glucosa liberada (que inhibe la síntesis de FOS) por la β -fructofuranosidasa libre de *A. niger* ATCC 20611, en una reacción discontinua donde la concentración inicial de sacarosa fue solo de 300 g/L y la concentración de 1-kestosa final resultó 38,7% de los FOS totales (Nishizawa y cols., 2001; *Food Sci. Tech. Res.* 7,1 39-44). Bajo estas condiciones, la producción industrial de 1-kestosa sería poco rentable. No existen informes ni patentes relacionadas con el uso de BRM para obtener 1-kestosa. Por todo lo expresado anteriormente, sigue siendo de interés lograr tecnologías de producción de 1-kestosa con alta productividad y bajos costos.

Explicación de la invención

La presente invención resuelve el problema antes planteado, al proveer un método para la obtención de 1-kestosa a escala industrial, a partir de la sacarosa, mediante una tecnología sencilla, barata, eficiente y escalable industrialmente. El método de la invención se caracteriza porque la conversión de la sacarosa en 1-kestosa en un biorreactor se realiza mediante el empleo de una FTF recombinante, aislada de *F. arundinacea*, expresada constitutivamente en una levadura hospedera no sacarolítica.

El método, descrito por primera vez en esta invención, aborda de forma integral la solución a las principales limitaciones tecnológicas existentes en el proceso de obtención de FOS a partir de la sacarosa, en particular las limitaciones relativas a la obtención de 1-kestosa. El procedimiento descrito incide en las dos etapas fundamentales del proceso: 1- Producción de la enzima o biocatalizador, y 2- Producción de 1-kestosa.

A los efectos de la presente invención, escala industrial es aquella escala de producción de 1-kestosa cuyo volumen total o parcial de producto se emplea con fines comerciales. Para ello se pueden utilizar equipos comunes por su diseño y disponibles en el mercado.

En el contexto de la invención, se define como levadura no sacarolítica a aquella levadura salvaje o mutada carente de actividad hidrolítica sobre la sacarosa. Dentro de este tipo de levaduras se encuentran, por ejemplo, las levaduras metilotróficas *P. pastoris* y *Hansenula polymorpha*, así como la levadura mutada *Saccharomyces*

cerevisiae YSH 2.64-1A (Rehm y cols., 1998; *Journal of Bacteriology* 180(5): 1305-1310).

En una materialización de la invención la FTF es la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST (SEQ ID NO. 1)). En la invención, a esta enzima obtenida por tecnología del ADN recombinante se le denomina 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec. Para optimizar la etapa de obtención y producción de la enzima, en esta invención se parte de un proceso de selección e identificación de FTFs de plantas, tipo 1-SST (SEQ ID NO. 1), aisladas de festuca (*F. arundinacea*), cebolla (*A. cepa*) y agave (*A. tequilana*), respectivamente. Este enfoque no se había abordado en reportes de la literatura relacionados con la producción industrial de FOS. Los genes codificantes para cada una de ellas se clonaron en un casete de expresión, para la modificación genética de la levadura *P. pastoris*. A pesar de las posibles limitaciones productivas de esta levadura como hospedero para la producción industrial, como por ejemplo la limitación por oxígeno disuelto durante su crecimiento, este microorganismo (carente de actividad sacarolítica endógena), es reconocido por los altos niveles de secreción de las proteínas heterólogas al medio de cultivo, el alto rendimiento de biomasa bajo condiciones controladas de producción en fermentadores, y es considerado GRAS desde el punto de vista de los reglamentos de bioseguridad para el procesamiento de alimentos. Por tanto, es parte de la invención el método de producción de 1-kestosa antes referido, donde la levadura hospedera no sacarolítica es una cepa de *P. pastoris*. En una primera fase de esta investigación, en la expresión del gen codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, se utilizó con éxito el promotor de regulación transcripcional de la enzima alcohol oxidasa I (*pAOXI*). Sin embargo, el uso de este promotor, inducible con metanol, no es aceptado para procesos industriales a gran escala, debido al gran volumen de metanol a manipular, su volatilidad y su carácter inflamable. Por otra parte, no es permitido el uso de este alcohol en el procesamiento de alimentos, o sus ingredientes. Sorprendentemente, la expresión del gen codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, utilizando un promotor constitutivo derivado del gen de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*pGAP*) no resultó tóxico a la levadura hospedera, y permitió obtener altos niveles de biomasa y niveles de expresión de la enzima secretada al medio extracelular, superiores a las otras dos FTFs estudiadas en la invención. Cabe destacar que es la primera vez que se utiliza con éxito este promotor para la expresión de un gen codificante para una FTF de origen vegetal. Tres transformantes por cada una de las enzimas estudiadas se cultivaron en fermentadores de 5 litros de volumen de trabajo, siguiendo una estrategia de cultivo incrementado. Transcurridas las 72 horas de fermentación, los caldos de cultivos se sometieron a un proceso de centrifugación, obteniéndose dos fracciones: una de células o biomasa, y una de sobrenadante de cultivo. Ambas fracciones se sometieron

a ensayos de actividad enzimática de corta duración, de 30 minutos, se incubaron con una solución de sacarosa 0,87 M (300 g/L), en tampón de acetato de sodio 0,02 M; pH 5,5 a 30°C. En esas condiciones, se observó que los tres clones ensayados, portadores de una copia del gen *1-sstf*, codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1) aislada de *F. arundinacea*, mostraban en ambas fracciones los mayores niveles de glucosa liberada, indicando una actividad muy superior a la de las restantes enzimas ensayadas. La 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec aislada de *F. arundinacea*, sorprendentemente, resultó más estable que sus homólogas de cebolla y agave, lo que permite la producción de 1-kestosa en gran escala.

Múltiples copias del gen *1-sstf* se utilizaron para modificar genéticamente, por recombinación homóloga doble y simple, la levadura *P. pastoris*, hasta obtener la cepa CIGB 308. Esta cepa contiene integradas, de forma estable en su genoma, nueve copias del referido gen. Por tanto, es objeto de la invención un método para la producción de 1-kestosa a escala industrial donde la cepa de *P. pastoris* contiene múltiples copias del gen codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1) integrado en su genoma.

Cuando se cultiva en un fermentador, la cepa de *P. pastoris* CIGB 308 produce la enzima 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec. Esto ocurre tanto cuando se opera el fermentador de forma discontinua, como continua o por lote alimentado, y además utilizando un medio de cultivo salino suplementado con extracto de levadura, sales trazas y vitaminas, y empleando como fuente de carbono el glicerol o la glucosa, aunque es preferible la utilización de sacarosa o materias primas que la contengan, debido a que con este sustrato se obtienen los mayores rendimientos productivos.

Por tanto, en un aspecto de la invención, la FTF que se emplea en la producción de 1-kestosa a escala industrial se obtiene en el sobrenadante del cultivo de *P. pastoris* y/o en el sedimento celular. En una materialización de la invención la FTF se produce por cultivo de la levadura recombinante en un fermentador operado de forma discontinua, continua, o incrementado. En una realización particular, la fuente de carbono que se emplea en el cultivo es un compuesto que se selecciona entre glicerol, glucosa, y sacarosa de cualquier grado de pureza.

Los niveles de actividad enzimática extracelular obtenidos en esta invención se aproximan al valor medio informado para enzimas de hongos, que está por debajo de 100,0 U/mL (Driouch y cols., 2010; *Appl Microbiol Biotechnol* 87:2011–2024), pero son muy superiores a los que han sido descritos para una FTF recombinante, de cualquier origen, expresada en levaduras (Trujillo y cols., 2002; *Afinidad* 59 (500):365-370; Rehm y cols., 1998; *Journal of Bacteriology* 180 (5): 1305-1310). En cuanto a la actividad en la fracción intracelular, la combinación de la alta actividad con la alta densidad celular origina rendimientos en biomasa que superan las 38 000 U/L de cultivo, lo que es

equivalente a 6 o 7 veces más que los mayores valores reportados en la literatura para enzimas de hongos (Dorta y cols., 2006; *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33(12): 1003-1009).

A pesar de que *P. pastoris* también presenta algunas limitaciones productivas que ya se han mencionado, su uso como hospedero para la expresión recombinante de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, tal como se describe en esta invención, elimina varias de las limitantes productivas de los hongos utilizados en la industria como fuentes naturales de FTFs, que se describieron anteriormente. *P. pastoris* es un microorganismo GRAS, desde el punto de vista de los reglamentos de bioseguridad para el procesamiento de alimentos.

En una materialización de la invención, la concentración de sacarosa empleada para la obtención de 1-kestosa a escala industrial es superior a 400 g/L. En una realización de la invención, la conversión de la sacarosa en 1-kestosa se realiza mediante la 1-SST (SEQ ID NO. 1) en su forma libre o inmovilizada.

En un aspecto de la invención, la conversión de la sacarosa en 1-kestosa se realiza en un biorreactor de tipo tanque agitado, lecho fijo o de membrana. En una realización particular, el BRM se opera de forma continua o semicontinua.

Es también objeto de la presente invención, un preparado enzimático para la conversión de la sacarosa en 1-kestosa, a escala industrial, que se caracteriza porque comprende la 1-SST (SEQ ID NO. 1), aislada de *F. arundinacea*, expresada constitutivamente en una levadura no sacarolítica.

A los efectos de la invención, un preparado enzimático es aquella formulación líquida o sólida que tiene actividad enzimática y es capaz de reaccionar con un sustrato específico para transformarlo en un producto.

En una materialización de la invención, la levadura no sacarolítica de la que se obtiene la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec es una cepa de *P. pastoris*. En una realización particular, dicha cepa de *P. pastoris* contiene múltiples copias del gen codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1) integrado en su genoma. A partir de dicho cultivo, la 1-SST (SEQ ID NO. 1) se obtiene en el sobrenadante y/o en el sedimento celular del mismo. A su vez, a los propósitos de la invención, la 1-SST (SEQ ID NO. 1) puede estar en estado líquido o sólido, libre o inmovilizada. En una materialización de la invención, la concentración de sacarosa que se emplea en la obtención industrial de 1-kestosa, mediante los preparados enzimáticos que comprenden la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, es superior a 400 g/L.

Como se demuestra en los ejemplos, los preparados enzimáticos de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, líquidos o sólidos, libres o inmovilizados, obtenidos a partir del sobrenadante de cultivo, o de la biomasa, de la cepa de *P. pastoris* CIGB 308, a través de procesos convencionales de purificación, secado e inmovilización de proteínas, resultaron lo

suficientemente estables térmicamente para ser almacenados y comercializados. Debido a esta característica, dichos preparados pueden ser finalmente utilizados como biocatalizadores en la producción industrial de FOS, dando así paso a la segunda etapa del método de obtención de 1-kestosa de la invención. Los preparados enzimáticos de la misma, en sus diferentes variantes, tienen como generalidad que, en presencia de sacarosa como sustrato, son capaces de producir FOS con una conversión superior al 55%, y de ellos específicamente la 1-kestosa en más de un 90%. En una materialización de la invención, la reacción de síntesis de 1-kestosa tiene lugar en las siguientes condiciones: Concentraciones de sacarosa de 200-800 g/L, preferiblemente 600 g/L; pH de 4,0-7,0; pH óptimo 5,5; Temperatura 30-50 °C, preferiblemente 40°C; Concentración de enzima/ Cantidad de sustrato dado en U/g, de 2-40, para tiempos de reacción de 1-24 horas, preferiblemente 15 U/g para tiempo de reacción de 3 horas, aplicable a cualquier variante de preparación enzimática de que se disponga, e independientemente del tipo de biorreactor y modo de operación descritos para producir FOS.

El método de la presente invención elimina las limitaciones que recoge el estado de la técnica, en cuanto al proceso de obtención industrial de FOS a partir de la sacarosa, en particular de la obtención de 1-kestosa. En vez de utilizar hongos o enzimas FTFs derivados de estos microorganismos, se utiliza una enzima vegetal recombinante, que inesperadamente, y a diferencia de otras FTFs vegetales ensayadas, se secreta establemente a altos niveles en *P. pastoris*, y produce 1-kestosa eficientemente, como resultado de su acción sobre la sacarosa. Con anterioridad a la presente invención, no se habían utilizado enzimas vegetales recombinantes en la producción industrial de FOS. Por otro lado, en la tecnología de reactores tipo tanque agitado, generalmente utilizada para reacciones enzimáticas industriales, la enzima se utiliza una sola vez, lo que se traduce en una baja productividad, variación de la calidad del producto (debido a las diferencias de lote a lote), etc. En una materialización de la invención, el uso de la enzima libre a través de un BRM, ya sea en forma discontinua, continua o secuencial (preferiblemente esta última) permite aumentar la productividad, pues en menos tiempo se alcanzan similares conversiones a las alcanzadas en el reactor tipo tanque agitado, donde más 55% de la sacarosa se transforma en FOS, y de ellos la 1-kestosa representa más de un 90%.

Estos resultados superan lo reportado, y solucionan al mismo tiempo las limitaciones de las tecnologías existentes para la producción industrial de 1-kestosa, basadas en el uso de hongos filamentosos. Por otra parte, el método de la invención requiere de menor costo de inversión, menor consumo energético, menor consumo de enzima por cantidad de 1-kestosa producida, y reduce el número de operaciones en el refinado del producto final.

Como se ha planteado, aplicando el método de la invención se resuelven las limitantes presentes en los procesos de producción de FOS hasta ahora descritos, para cualquier microorganismo y tipo de reactor.

Por vez primera, se utiliza la 1-SST (SEQ ID NO. 1) de *F. arundinacea* para la obtención industrial de 1-kestosa. No hay informes de producción industrial de FOS utilizando una FTF recombinante de origen vegetal. Inesperadamente, y a diferencia de otras FTFs vegetales ensayadas, esta enzima se produce de forma estable, a altos niveles y es secretada al medio de cultivo por la levadura hospedera *P. pastoris*. Además de estas ventajas tecnológicas, la enzima recombinante de la invención produce mayoritariamente 1-kestosa, como resultado de su acción sobre la sacarosa a concentraciones superiores a 400 g/L.

Las enzimas de hongos sintetizan también este trisacárido, pero lo utilizan en mayor medida, casi desde el inicio de la reacción, como sustrato para producir 1-nistosa y fructosilnistosa, lo que atenta contra el rendimiento final de 1-kestosa.

Por otra parte, actualmente no existen en el mercado internacional proveedores de FTFs para la producción masiva de FOS. Con el método de la invención se crea un nuevo procedimiento, de bajo costo, para la producción industrial de una FTF vegetal recombinante, alta productora de 1-kestosa, lo que facilita la disponibilidad comercial de este tipo de enzimas. El uso de la FTF de *F. arundinacea* recombinante, sorprendentemente, tiene como ventaja adicional que abarata el proceso de obtención de FOS y de 1-kestosa, con relación a las otras tecnologías de producción de FOS.

Por tanto, la invención provee un método para la obtención de 1-SST (SEQ ID NO. 1) a escala industrial, el que se caracteriza porque se cultiva en fermentadores una levadura no sacarolítica que contiene múltiples copias del gen codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1), aislado de *F. arundinacea*, integrado en su genoma. Dicha levadura expresa constitutivamente la mencionada enzima. En una materialización de la invención, la levadura no sacarolítica que expresa constitutivamente la 1-SST (SEQ ID NO. 1) es una cepa de *P. pastoris*. A los propósitos de la invención, la 1-SST (SEQ ID NO. 1) se obtiene del sobrenadante del cultivo de *P. pastoris* y/o del sedimento celular del mismo.

A los efectos de la presente invención, escala industrial de producción de 1-SST (SEQ ID NO. 1) es aquella escala que implica el cultivo en fermentadores de una cepa productora de 1-SST (SEQ ID NO. 1), cuyo volumen total o parcial de 1-SST (SEQ ID NO. 1) supere las 10 000 U de enzima.

Contrario a los reportes encontrados en la literatura especializada, en una realización de la invención, por primera vez, se combina el uso de la mencionada FTF vegetal con el empleo de un BRM, lo que optimiza el proceso para obtener altos rendimientos de FOS y de 1-kestosa. Los resultados obtenidos con esta combinación resultaron sorprendentes, por encima de los valores de rendimiento calculados teóricamente a

- partir de modelaciones matemáticas. Además, este proceso elimina las inconsistencias entre lotes y la variabilidad en los productos encontradas cuando se utilizan otros tipos de reactores, ya que permite reutilizar la FTF de forma soluble, y con ello se alcanzan relaciones enzima-sustrato factibles desde el punto de vista técnico y económico, 10
- 5 veces superiores a las utilizadas en tanque agitado. Estas dos ventajas se traducen en la disminución de los tiempos de reacción a 3 horas, aumentando la productividad por día en al menos 5 veces respecto al tanque agitado, disminuyendo consecuentemente los costos de producción. Por otra parte, se reduce la manipulación y el espacio físico destinado a la producción.
- 10 Otro aspecto de la presente invención es un producto para la alimentación humana o animal que comprende la 1-kestosa obtenida mediante el empleo del método de la invención, el que se caracteriza porque la conversión de la sacarosa en 1-kestosa en un biorreactor se realiza mediante el empleo de una FTF recombinante, aislada de *F. arundinacea*, expresada constitutivamente en una levadura hospedera no sacarolítica.
- 15 En una realización particular, el producto para la alimentación humana o animal se caracteriza porque adicionalmente se formula con preparados probióticos, formando simbióticos para su uso como nutraceutico.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación gráfica de los casetes de expresión resultantes de la inserción de los genes codificantes para la 1-SST (SEQ ID NO. 1) de festuca (*1-sstf*), cebolla (*1-sstc*) y agave (*1-ssta*), respectivamente, en el vector de expresión pGAPZ α A,B,C. Los plasmidios resultantes se denominaron p1-SST (SEQ ID NO. 1)F (1-SST (SEQ ID NO. 1) de festuca), p1-SST (SEQ ID NO. 1)C (1-SST (SEQ ID NO. 1) de cebolla) y p1-SST (SEQ ID NO. 1)A (1-SST (SEQ ID NO. 1) de agave), respectivamente. P_{GAP} : promotor GAP, **SP**: péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, His_6 : cola de polihistidina, **TT**: terminador de la transcripción del gen *AOX1*.

Figura 2. Estrategia de construcción del plasmidio p1SSTF6x + 6 copias adicionales del casete de expresión, utilizado para la expresión constitutiva de varias copias del gen *1-sstf* en la cepa *P. pastoris* GS115. **A.** Construcción con una sola copia del gen. **B.** Construcción con seis copias del gen, selección por complementación del gen *histidina 4*. **C.** Construcción con nueve copias del gen y resistencia a higromicina. P_{GAP} : promotor GAP, **5'AOX1**: promotor de la alcohol oxidasa, **SP**: péptido señal del factor α de *S. cerevisiae*, His_6 : cola de polihistidina, **TT**: terminador de la transcripción del gen *AOX1*, **His4**: marco abierto de lectura del gen *his4*.

Figura 3. Curso temporal de la reacción de síntesis de FOS en un reactor tipo tanque agitado, catalizado por la enzima 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec. Condiciones de reacción: 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec 9000 U/L, sacarosa 600 g/L en 0,1 M de tampón acetato de sodio pH 5,5; temperatura 40°C, velocidad de agitación 250 revoluciones por minuto (rpm), tiempo de reacción 6 horas. Leyenda: Kestosa (GF₂); Nistosa (GF₃), FOS totales (FOS = GF₂+GF₃); Sacarosa (GF); Glucosa (G); Fructosa (F).

Figura 4. Cromatograma del perfil de productos resultante del análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las muestras tomadas a diferentes tiempos de reacción (t_r). **A.** Patrón de tiempos de retención de Nistosa (GF₃), Kestosa (GF₂), Sacarosa GF, Glucosa (G), Fructosa (F). **B.** Reacción de síntesis de FOS por la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec a tiempo $t_r=0$. **C.** $t_r=180$ minutos, **D.** $t_r=360$ minutos.

Figura 5. Representación esquemática del sistema de producción de FOS en un BRM.

Figura 6. Curso temporal de la síntesis de 1-kestosa catalizada por la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec en un BRM, operado de forma semicontinua, durante 3 ciclos consecutivos. Condiciones de reacción: 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec 9000 U/L, sacarosa 600 g/L en 0,1 M de tampón acetato de sodio pH 5,5; temperatura 40°C, velocidad de agitación 250 rpm. Secuencia de operación: Ciclo No. 1- reacción de síntesis continua por 3 horas, y descarga 30 minutos; Ciclos No. 2 y 3- síntesis por 2 horas y 30 minutos, y descarga 30 minutos.

Figura 7. Cromatograma del perfil de productos resultante del análisis por HPLC de las muestras tomadas al concluir cada uno de los ciclos de síntesis de FOS en un MBR operado de forma semicontinua. **A.** Ciclo No. 1, **B.** Ciclo No. 2 y **C.** Ciclo No. 3. Leyenda: Nistosa (GF₃), Kestosa (GF₂), Sacarosa (GF), Glucosa (G), Fructosa (F).

5

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Estudio comparativo de los niveles de actividad fructosiltransferasa (FTF) de 3 sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasas (1-SST (SEQ ID NO. 1)) de plantas producidas en *Pichia pastoris*

10 Para comparar los niveles de actividad FTF en *P. pastoris* de tres 1-SST (SEQ ID NO. 1) de plantas, los ADN complementarios codificantes para las enzimas de festuca (*F. arundinacea*), de cebolla (*A. cepa*) y de agave (*A. tequilana*) se aislaron de sus hospederos naturales, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-RCP) y los cebadores descritos en la literatura (Vijn y cols., 15 1998; *The Plant Journal*. 11 (3): 387-398; Luscher y cols., 2000; *Plant Physiology* 124 (3):1217–1227; Avila-Fernandez y cols., 2007; *Plant Science* 173: 478–486). Los productos resultantes de estas RCPs correspondientes a los ADNs codificantes para las enzimas maduras (Tallas: 1-SST (SEQ ID NO. 1) de festuca: 1668 pb, 1-SST (SEQ ID NO. 1) de cebolla: 1668 pb y 1-SST (SEQ ID NO. 1) de Agave: 2026 pb) se 20 fusionaron en su extremo 5', siguiendo el marco de lectura apropiado, al péptido señal del factor α de *S. cerevisiae*, y en el extremo 3' a las secuencias que codifican para el epítotope *myc*, seguido de una cola de seis residuos de histidina, presentes en el vector comercial pGAPZ α C (Invitrogen, Leek, Holanda). Este vector comercial permite la selección de los transformantes mediante la resistencia al antibiótico zeocina. En las 25 tres construcciones obtenidas, denominadas p1-SST (SEQ ID NO. 1)F (1-SST (SEQ ID NO. 1) de festuca), p1-SST (SEQ ID NO. 1)C (1-SST (SEQ ID NO. 1) de cebolla) y p1-SST (SEQ ID NO. 1)A (1-SST (SEQ ID NO. 1) de agave), los genes quiméricos codificantes para las tres 1-SST (SEQ ID NO. 1)s quedaron bajo el control transcripcional del promotor GAP y el terminador de la transcripción de la alcohol oxidasa 1 (*AOX1TT*), como muestra la Figura 1. Las tres construcciones se digirieron 30 con la enzima de restricción *AvrII*, de sitio único en la secuencia del promotor *GAP*, y se introdujeron por electroporación en el genoma de la levadura hospedera cepa X-33. Como resultado, se obtuvieron alrededor de 20 transformantes para cada construcción, en medio YP suplementado con glicerol al 2% y zeocina 100 μ g/mL. Para el estudio 35 comparativo, 3 clones resistentes a zeocina, de cada una de las tres variantes, se crecieron en un fermentador de 5 litros de volumen efectivo, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento celular. Cada fermentador se inoculó con 200 mL de un inóculo previo de cada clon crecido en zaranda.

En la primera etapa de la fermentación, para mantener la concentración de oxígeno disuelto a valores por encima de 20%, se aumentó automáticamente la agitación entre 500 y 900 rpm, y la aireación se mantuvo a 1 vvm (volumen de aire/ volumen de medio/minuto). Una vez que aumentó el valor del oxígeno disuelto, indicativo de que se agotó el glicerol utilizado como fuente de carbono, se pasó a la segunda etapa de alimentación. Al comenzar la segunda etapa, se aumentó el flujo de aire hasta 2 vvm, y se alimentó el cultivo con 1,5 L de incremento (de la misma fuente de carbono inicial), a un flujo entre 5 y 7 mL/L/h, controlado por las variaciones de oxígeno disuelto. No se observaron efectos tóxicos durante las 72 horas del cultivo de las cepas recombinantes, con relación a la cepa natural no recombinante crecida en condiciones similares. A continuación, el cultivo final se separó por centrifugación generando dos fracciones, un sedimento (células o biomasa) y un sobrenadante de cultivo. Se tomaron muestras de 0,2 mL de ambas fracciones, y reaccionaron durante 30 minutos con una solución de sacarosa a 300 g/L (0,87 M). La concentración de glucosa liberada, como resultado de la reacción de transfructosilación sobre la sacarosa, se utilizó como indicativo del nivel de actividad FTF de los clones recombinantes. El hecho de contar con una curva patrón de glucosa permitió relacionar la concentración de este azúcar con la intensidad del color en el producto de la reacción colorimétrica del complejo enzimático glucosa oxidasa / peroxidasa / cromógeno, del juego de reactivos "Glucose -Trinder" (Sigma, Estados Unidos), y clasificar los niveles de actividad en altos (color rojo intenso, concentración de glucosa superior a 5,5 mM), moderados (color rosado claro, concentraciones de 0,5-5,5 mM) y no detectables (color de apariencia transparente y concentraciones inferiores a los 0,5 mM). No se observó actividad detectable ni en el sedimento ni en el sobrenadante del cultivo en los clones transformados con el gen codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1) de agave ni de cebolla, en las condiciones de reacción ensayadas. Sólo después de 3 y 5 horas de reacción, respectivamente, se logró obtener para ambos casos un color rosado claro en los sobrenadantes de los cultivos, lo que se corresponde con una actividad enzimática baja-moderada. Por el contrario, se observó un color rojo intenso en los 3 clones recombinantes transformados con el gen *1-sstf* codificante para la 1-SST (SEQ ID NO. 1) de festuca, indicativo de altos niveles de actividad FTF, bajo estas condiciones de reacción.

Ejemplo 2. Valores medios de los parámetros analizados durante la fermentación de los tres clones de expresión constitutiva con alta actividad FTF portadores de una copia del gen *1-sstf*

Los tres clones con una copia del gen *1-sstf* incorporada en su genoma se compararon a nivel de fermentadores, utilizando las mismas condiciones experimentales descritas en el Ejemplo 1.

Una unidad (U) 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec representa la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto, al reaccionar con una solución de sacarosa al 50% (1,46 M), en tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 5,5), durante 30 minutos a 30°C. Los datos que se muestran en la Tabla 1 representan la media de los valores de los parámetros obtenidos en las tres fermentaciones de cada clon evaluado \pm la desviación estándar.

Tabla 1. Comparación de parámetros analizados durante la fermentación de los tres clones evaluados con actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec

Parámetro	Valor
Rendimiento en biomasa (g/L de cultivo)	366 \pm 4
Actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec Intracelular (U/g de biomasa húmeda)	4,3 \pm 0,2
Actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec Extracelular (U/L de sobrenadante cultivo)	3,7 \pm 0,1
Tiempo de Cultivo (Horas)	69
Actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec total (U/L de cultivo)	3955 \pm 211
Actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec total en Biomasa (U/L de cultivo de cultivo)	1573,8 \pm 25,6
Productividad de actividad en biomasa (U/L/h)	22,8

La productividad de estos tres clones fue 2 veces superior en el sistema de expresión constitutivo que cuando se utilizó un sistema de expresión inducible por metanol, ya que se alcanzó una mayor concentración de células (366 g/L) en un menor tiempo (69 horas).

Ejemplo 3. Aumento de la actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec por integración de múltiples copias del casete de expresión del gen *1-sstf* en el locus *AOX1* de *Pichia pastoris*

El desarrollo de una tecnología rentable de producción de FOS a escala industrial requiere contar con altos niveles de actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, por lo que se necesita aumentar la dosis génica en la levadura hospedera. Para obtener varias copias del casete de expresión, dispuestas de forma consecutiva y en la misma dirección transcripcional, se digirió el plasmidio p1-SST (SEQ ID NO. 1)F, que posee una sola copia del casete de expresión que contiene el gen *1-sstf*, con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bg*III. La banda de 2,82 kb que contiene el casete de expresión, se aisló en gel de agarosa y se religó mediante la T4 ligasa. La unión de extremos *Bam*HI (G↓GATCC) y *Bg*III (A↓GATCT) genera un sitio híbrido de secuencia GGATCT, que no es reconocido por ninguna de estas dos enzimas. A la reacción de ligación se adicionaron las enzimas *Bam*HI y *Bg*III para favorecer la unión de extremos diferentes. La banda de 5,64 kb que contiene dos copias del casete de expresión se aisló y se

trató una vez más con las enzimas *Bam*HI y *Bgl*II para garantizar que los casetes de expresión estén unidos en la misma dirección transcripcional. Esta secuencia se insertó en el mismo plasmidio p1-SST (SEQ ID NO. 1)F digerido con *Bam*HI y desfosforilado con fosfatasa alcalina.

5 La nueva construcción (p1-SST (SEQ ID NO. 1)F3x) porta tres copias del casete de expresión. El p1-SST (SEQ ID NO. 1)F3x se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Bgl*II, la banda de 8,46 kb obtenida se aisló y religó como está descrito en el paso anterior. La secuencia de 16,92 kb se insertó en el vector pAO815, digerido con la enzima *Bam*HI y desfosforilado con fosfatasa alcalina. Este vector permite seleccionar los
10 transformantes de la cepa *P. pastoris* GS115 por complementación de la auxotrofia *his4*. El plasmidio resultante (p1SSTF6x) contiene seis copias del casete de expresión, dispuestas de forma consecutiva y en la misma dirección transcripcional, insertadas entre el promotor *AOX1* y un fragmento 3' de la región terminadora del locus *AOX1* (Figura 2). Este plasmidio se digirió con la enzima *Bgl*II para la transformación por
15 electroporación de la cepa *P. pastoris* GS115. Con esta digestión se generan dos fragmentos, uno de ellos, de 22,23 kb, porta en el centro los seis casetes de expresión y el gen que complementa la auxotrofia *his4*; en el extremo 5' se encuentra el promotor *AOX1* y en el 3' se encuentra un fragmento 3' de la región terminadora del locus *AOX1*. Con esta estrategia se favorece la recombinación homóloga doble que reemplaza
20 el locus *AOX1*.

Las colonias de la cepa GS115 transformadas con el plasmidio p1-SST (SEQ ID NO. 1)F6x se seleccionaron en medio mínimo YNB suplementado con glucosa al 2%. Con el objetivo de evaluar la capacidad de los transformantes para utilizar la sacarosa como
25 fuente de carbono, 93 colonias His4⁺ se crecieron de forma individual en una placa de 100 pocillos en medio sólido YP (pH 5,5) suplementado con sacarosa al 5% y el indicador de pH bromotimol azul 0,025%. El clon GS115/p1-SST (SEQ ID NO. 1)F, con una copia del gen *1-ssf* de festuca (PF1x), se utilizó como control positivo de este experimento. Dos clones denominados PF6Xa y PF6Xb transformaron el color del
30 medio desde el verde inicial (pH 5,5) a amarillo (pH ≤ 6,0), debido a la reacción de transfructosilación de la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, por lo que se produce ácido láctico por el consumo de la glucosa liberada de la sacarosa. Este cambio de color del medio ocurrió con mayor rapidez en las cepas multicopias que en la cepa portadora de una sola copia del gen. Este hecho es indicativo de una mayor actividad enzimática por parte de los clones multicopias.

35 Para corroborar este resultado, los clones multicopias PF6Xa y PF6Xb, así como el simple copia PF1x, se crecieron en 10 mL de medio líquido YP, suplementado con glicerol al 2% en zaranda orbital durante 24 horas a 28°C. Se determinó la glucosa liberada como consecuencia de la actividad FTF de la enzima recombinante, en las

fracciones correspondientes al sedimento (células o biomasa) y el sobrenadante de cultivo de ambos clones multicopias, así como del clon que porta simple copia, mediante la reacción colorimétrica del complejo enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa/cromógeno, del juego de reactivos "Glucose –Trinder" (Sigma), de igual forma que en el Ejemplo 1.

Los dos clones multicopias mostraron mayor actividad enzimática que el simple copia (Tabla 2), lo que demuestra que al aumentar las copias del gen *1-ssstf* integradas en el genoma de *P. pastoris* aumentó la actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec en estas dos cepas recombinantes. El clon PF6Xb mostró una actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec en el sobrenadante de cultivo 31,4% mayor que el clon PF6Xa, y 64,2% mayor que el clon simple copia. En la biomasa se observa que el clon PF6Xb tuvo una actividad enzimática 18% mayor que la del clon PF6Xa, y 36% mayor que la del clon simple copia. La Tabla 2 muestra el efecto del número de copias del gen *1-ssstf* sobre la actividad enzimática, en los clones multicopias de *P. pastoris*. Como control se utilizó la cepa GS115, y el clon simple copia. Las letras diferentes a la derecha de los datos indican diferencias significativas determinadas por un Análisis de Varianza de Clasificación Simple con la utilización del paquete estadístico StatGraph3. Los valores de la media ($n=3$) de la actividad enzimática se compararon entre sí mediante la prueba de comparación de medias de Tukey HSD ($p<0,01$).

Tabla 2. Comparación de la actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec en clones simple- y multicopias.

Cepa	Actividad Enzimática Específica ($\times 10^{-3}$ UAE/D.O ₆₀₀)	
	Biomasa (B)	Sobrenadante (S)
GS115	0,1081 \pm 0,0015 ^d	0,1523 \pm 0,0017 ^d
PF1X	2,5813 \pm 0,0012 ^c	4,7830 \pm 0,0015 ^c
PF6Xa	4,9717 \pm 0,0020 ^b	9,1545 \pm 0,0021 ^b
PF6Xb	7,3548 \pm 0,0014 ^a	13,3512 \pm 0,0016 ^a

Unidades de actividad enzimática / densidad óptica medida a la longitud de onda de 600 nm (UAE/D.O₆₀₀). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las actividades enzimáticas comparadas entre sí mediante la prueba de comparación de medias de Tukey HSD ($p<0,01$).

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó el clon multicopia PF6Xb, denominado de ahora en lo adelante como PF6X para continuar los experimentos de expresión, por ser el que presentó la mayor actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, tanto en la biomasa como en el sobrenadante del cultivo.

Ejemplo 4. Incremento de la actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1) mediante retransformación del clon multicopia PF6X para la inserción de 6 copias adicionales del casete de expresión en el locus AOX1

Para aumentar la actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1) del clon PF6X se construyó un nuevo plasmidio denominado pALS223. Para obtener esta nueva construcción, la secuencia de 16,92 kb que contiene seis copias del casete de expresión dispuestas de forma consecutiva, y en la misma dirección transcripcional utilizada para construir el plasmidio p1-SST (SEQ ID NO. 1)F6x, se insertó en el vector pPICH α C AOX1-linker, digerido *Bam*HI y desfosforilado con fosfatasa alcalina. Este vector permite la recombinación homóloga simple por el promotor AOX1 de *P. pastoris* y la selección de los transformantes con el antibiótico higromicina. Después de chequear esta construcción genética por análisis de restricción y secuenciación de ADN, se procedió a digerir este nuevo plasmidio con la enzima *Hpa* I, para linealizarlo y retransformar por electroporación el clon PF6X. Esta enzima corta en un sitio el promotor AOX1 del plasmidio, lo que favorece su integración en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga simple en el locus AOX1. Los transformantes con más de 6 copias del casete de expresión, insertadas en el genoma de la levadura hospedera, se seleccionaron en medio YP sólido suplementado con glicerol 2% e higromicina 0,2 g/L. A más de 60 colonias resistentes al antibiótico Higromicina (*HigR*), conjuntamente con la cepa PF6x y PF1x, se les determinó la actividad enzimática en la biomasa y el sobrenadante de cultivo, como se describió en ejemplos anteriores, utilizando la reacción colorimétrica del complejo enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa/cromógeno del juego de reactivos "Glucose –Trinder". Uno de los clones resistentes a higromicina analizados, denominado CIGB 308, fue el que mayor actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec mostró, tanto en el sedimento celular como en el sobrenadante del cultivo. Este nuevo clon presentó mayor actividad enzimática en el sobrenadante (1,87 veces) y en la biomasa (1,76 veces) que el clon PF6X. Respecto a la cepa simple copia, la actividad del clon CIGB 308 fue 3,58 veces mayor en el sobrenadante; y 2,41 veces mayor en la biomasa, lo que confirma que al aumentar el número de copias del gen *1-sstf* integradas de forma estable en el hospedero, aumenta la actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1)de la levadura hospedera. Un análisis tipo *Southern blot* reveló que en el clon CIGB 308 se integraron de forma estable 9 copias del casete de expresión. Estos resultados indican que en el evento de retransformación se insertaron solo 3 copias más del casete de expresión y no 6 como se esperaba.

Ejemplo 5. La cepa *P. pastoris* CIGB 308 tiene más actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1) y resulta más productiva que sus precursores PF1X y PF6X a nivel de fermentadores

Tanto el clon CIGB 308 como sus precursores, las cepas con una y seis copias del casete de expresión (PF1X y PF6X), se crecieron en fermentadores de 7,5 L con 5 L de volumen de trabajo, a 28°C, pH 5,5, agitación entre 500-900 rpm, aireación 1-2 vvm, y oxígeno disuelto controlado por encima del 20%. Las tres cepas, con independencia del número de copias insertadas, mostraron un patrón de crecimiento similar. Entre las 19 y 20 horas iniciales de cultivo se consumió todo el glicerol del medio, mientras que el descenso de la presión de oxígeno disuelto se reguló a 20%, por aumento paulatino de la agitación desde 500 hasta 900 rpm. Al consumirse el glicerol, se observó un rápido ascenso del oxígeno disuelto y se inició la alimentación del cultivo con glicerol 50% (v/v), hasta las 72 horas que duró el proceso.

Bajo estas condiciones de cultivo, la biomasa obtenida para los tres clones comparados fue de 358 ± 8 g/L de peso húmedo, por lo que podemos inferir que la dosis génica, así como la producción y acumulación de la enzima recombinante, no afectaron el crecimiento ni resultaron tóxicos a la levadura hospedera.

Pasadas las 70 - 72 horas de cultivo el clon CIGB 308 mostró la mayor actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1), tanto extra- como intracelular, llegando a un máximo de $29,7 \pm 0,2$ U/mL de cultivo y $12,4 \pm 0,2$ U/mL de cultivo (34 U/g de peso húmedo), respectivamente. De las $42,1 \pm 0,2$ U/mL totales detectadas por mL de cultivo del clon CIGB 308, el 70,6% de la actividad FTF se localizó en el sobrenadante de cultivo y el 29,4% en las células. A partir de este estudio se seleccionó el clon CIGB 308 para acometer la producción masiva de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec.

Hasta la fecha de esta invención no existían informes en la literatura describiendo la obtención, a nivel de fermentador, de una 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec de plantas expresada de forma constitutiva a partir un clon multicopia de *P. pastoris*.

Ejemplo 6. Cultivo incrementado de la cepa *Pichia pastoris* CIGB 308 utilizando sacarosa como fuente de carbono

El costo de la fermentación de la cepa *P. pastoris* CIGB 308 se reduce si se emplea una fuente de carbono más barata que el glicerol, tal como la sacarosa o la glucosa. La cepa *P. pastoris* GS115, utilizada como hospedero, carece de actividad invertasa, por lo que no puede utilizar la sacarosa como fuente de carbono. Sin embargo, debido a la nueva actividad FTF adquirida por la levadura hospedera, se genera glucosa como producto de la reacción de transfructosilación a partir de la sacarosa, la que se metaboliza directamente para el crecimiento de este microorganismo. Esta ventaja de la cepa recombinante permite reducir los costos de fermentación del proceso productivo.

La fermentación en sacarosa se realizó por cultivo discontinuo incrementado en un fermentador de 75 L de capacidad y 50 L de volumen de trabajo. Los parámetros ajustados fueron los siguientes: Temperatura: 28°C; pH: 5,5 Agitación: 600 rpm.

Aireación: 1,0 vvm. Presión de operación: 0,2 atm. La fuente de carbono utilizada fue la sacarosa a 50 g/L, contenida ya sea en azúcar refino, azúcar crudo o miel. Cuando comenzó a agotarse la fuente de carbono (detectado por aumento del pH o incremento de la presión de oxígeno), aproximadamente a las 20 h de iniciada la fermentación, se inició la adición de la solución de incremento (solución de la misma fuente de carbono utilizada inicialmente, pero a 500 g/L) a un flujo de incremento por volumen de cultivo inicial de 8 mL/L/h. En ese momento se reajustaron los parámetros de fermentación correspondientes a los siguientes valores: Agitación: 800 rpm y aireación: 1,5 vvm, presión de oxígeno: 0,4 atm. La fermentación se realizó por 72 h. Con estas condiciones de cultivo se obtuvieron rendimientos de producción de biomasa similares a los alcanzados con este clon crecido en medio con glicerol, mientras que la actividad enzimática total (en 72 horas de cultivo) fue muy superior para los medios que contenían sacarosa, independientemente de la materia prima en que estaba contenida. Los resultados del crecimiento de la cepa *P. pastoris* CIGB 308, utilizando las diferentes fuentes de carbono, se sintetizan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos tras el crecimiento de la cepa *P. pastoris* CIGB 308 a nivel de fermentadores, utilizando glicerol o sacarosa como fuente de carbono.

Fuente de carbono	Actividad Extracelular (U/mL de sobrenadante)	Actividad Intracelular (U/mL de cultivo)	U totales/mL de cultivo	Peso Húmedo (g/L)
Glicerol	29,7 ± 0,2 (50,8%)	18,4 ± 0,3 (49,2%)	37,4 ± 0,4	361 ± 4
Azúcar refino	101,6 ± 9,5 (62,02%)	38,9 ± 5,4 (37,98%)	102,4 ± 11,3	375 ± 9
Azúcar Crudo	53,9 ± 3,3 (46,3 %)	39,9 ± 2,9 (53,7 %)	74,2 ± 3,1	363 ± 4
Miel B	110,7 ± 0,2 (58,5 %)	49,6 ± 5,1 (41,5 %)	119,6 ± 6,3	368 ± 14

Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de actividad enzimática intracelular y extracelular de la cepa *P. pastoris* CIGB 308 a las 72 horas de cultivo. Una unidad de enzima (U) representa la cantidad de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec que libera 1 μ mol de glucosa por minuto a velocidades iniciales de la reacción en una solución de sacarosa a 1,75 M en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5, a 30°C. Los datos representan la media de las fermentaciones realizadas con cada una de la fuentes de carbono \pm la desviación estándar.

De acuerdo a estos resultados se concluyó que tanto la sacarosa como la miel resultan sustratos adecuados para acometer la producción industrial de esta FTF recombinante.

Ejemplo 7. Producción en cultivo continuo de la enzima 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec

No existen informes en la literatura que describan la producción continua de FTF recombinantes expresadas a altos niveles en *P. pastoris*. La producción continua de esta FTF se realizó en un fermentador INFORS HT, de 7,5 L totales y un volumen de trabajo de 5 L. Los siguientes parámetros se fijaron y registraron durante todo el cultivo, a través del Software Iris V 5.0: La temperatura se mantuvo a 28°C, mientras que el valor de pH 5,5 se controló por adición automática de NH₃OH (28%(v/v)) y H₃PO₄ (40% (v/v)). Durante todo el cultivo se mantuvo el oxígeno disuelto superior al 20%, variando automáticamente la agitación (entre 500 y 900 rpm), el flujo de aire (1-2 vvm) y la presión (0-0,7 atm).

El volumen inicial de fermentación fue de 3 L de medio que contiene 22 g/L de NH₄SO₄; 18,2 g/L de K₂HPO₄; 7,5 g/L de MgSO₄ 7H₂O; 0,5 g/L de CaCl₂ 2 H₂O; extracto de levadura 5 g/L, sales trazas y vitaminas, en cantidades suficientes más sacarosa 50 g/L. Para la etapa de incremento discontinuo se utilizó 1,5 L de una solución de sacarosa 500 g/L. En la etapa de cultivo continuo se utilizó un medio que contiene 200 g/L de sacarosa; extracto de levadura 2,5 g/L; 11 g/L de NH₄SO₄; 9,1 g/L de K₂HPO₄; 3,75 g/L de MgSO₄ 7H₂O; 0,25 g/L de CaCl₂ 2 H₂O; sales trazas y vitaminas.

Se inoculó el fermentador con 200 mL de inóculo crecido en zaranda. Una vez que se agotó la fuente de carbono, se pasó a la etapa de incremento discontinuo, donde se alimentó el cultivo a un flujo que varió entre 7-30 mL/L/h. Cuando se agotó el incremento se comenzó el cultivo continuo, alimentando el fermentador con una velocidad de dilución (D) de 1 día⁻¹. Una vez alcanzado el estado estacionario se mantuvo el cultivo operando durante 45 días, con un rendimiento medio en actividad de 70 ± 5 U/mL y una concentración celular de 352 ± 11 g/L de peso húmedo.

Ejemplo 8. Determinación de los parámetros óptimos de reacción de la enzima 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec para la síntesis de 1-kestosa

El preparado enzimático, obtenido en el sobrenadante del fermentador, se sometió a un proceso de filtración utilizando un filtro en un Sartocoon Slice 200 (Sartorius) con una membrana Hydrosart (0,2 µm), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el filtrado se concentró 10 veces por diafiltración, utilizando el mismo equipo con una membrana de ultrafiltración Hydrosart (10 kDa) contra tampón acetato de sodio 0,1 M obteniéndose una preparación final de 1000 U/mL. Opcionalmente, se sometió a un proceso de liofilización obteniéndose un preparado enzimático sólido con una actividad superior a 8500 U/g.

a) Determinación del pH óptimo para la actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1):

La actividad de la enzima 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec se examinó en un rango de pH entre 4 y 8. La reacción se realizó por 1 hora, a 30°C, en una solución de sacarosa a una concentración de 0,87 M y 10 U de enzima, en un volumen final de 0,5 mL. Para el

rango pH 4,0 – 5,5 se utilizó tampón acetato de sodio 0,1 M, y para pH entre 6,0 – 8,0 tampón fosfato 0,1 M. Los máximos valores de actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec se encontraron a pH entre 5,5 y 6,0.

b) Temperatura y concentración de sustrato óptimos para la síntesis de FOS:

- 5 Para la determinación de estos parámetros, 60 U de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec reaccionaron en tampón acetato de sodio 0,1 M; pH 5,5 con concentraciones de sustrato entre 200 y 600 g/L, a 30, 40 y 50°C, respectivamente, en un volumen final de reacción de 10 mL, y
- agitación de 250 rpm.
- 10 Transcurrida 1 hora de reacción, se determinó la composición de azúcares presentes en la mezcla de reacción, por HPLC. Para esta

	200g/L						
Temperatura	G	F	GF	GF ₂	GF ₃	r _(GF2)	R _{T/H}

cromatografía se aplicaron 20 µL de la muestra en una columna Aminex HPX 42-C (BioRad, Richmond), con un flujo de trabajo de 0,6 mL/min, una presión de aproximadamente 52 bar y una temperatura de trabajo de 81,7°C. La fase móvil utilizada fue agua. Se empleó un detector de índice de refracción Knauer Differential-
 20 Refractometer. Los azúcares se cuantificaron con ayuda del paquete informático BioCrom, versión 3.0, CIGB, 1996-1997.

La Tabla 4 muestra la composición y cuantificación porcentual de azúcares determinada para las diferentes condiciones, la velocidad de síntesis de 1-kestosa y la relación entre la actividad de transfructosilación y la actividad hidrolítica.

- 25 Se alcanzó la máxima velocidad de síntesis de 1-kestosa, con ausencia de actividad hidrolítica, a una temperatura de 40°C y una concentración de sacarosa de 600 g/L. Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó como preparado enzimático células intactas con actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1) periplasmática inmovilizadas en alginato de calcio y enzima inmovilizada de forma covalente a Eupergit (Sigma).

30

Tabla 4. Influencia de la temperatura y concentración de sustrato en la síntesis de FOS

	30°C	16,0	0,5	39,6	45,8	0,8	1,0	88	
	40°C	13,1	0,9	41,2	43,7	1,1	1,0	50	
	50°C	1,5	0,0	91,2	6,7	0,0	0,1	-	
	400g/L								
5	Temperatura	G	F	GF	GF ₂	GF ₃	r _(GF2)	R _{T/H}	
	30°C	11,8	0,1	58,0	29,9	0,3	1,3	585	
	40°C	11,0	0,4	48,6	39,3	0,8	1,8	111	
	50°C	2,4	0,0	86,3	11,1	0,0	0,5	-	
	600g/L								
10	Temperatura	G	F	GF	GF ₂	GF ₃	r _(GF2)	R _{T/H}	
	30°C	6,9	0,0	67,5	25,5	0,0	1,8	-	
	40°C	9,9	0,0	54,7	34,7	0,8	2,4	-	
	50°C	7,3	0,0	64,8	27,9	0,0	1,9	-	

Composición de reacción una hora de glucosa, (F) sacarosa, Kestosa, de la mezcla transcurrido reacción (G) fructosa, (GF) (GF₂) 1- (GF₃) nistosa

Parámetros de la reacción: (r(GF₂)) Velocidad de síntesis de la 1-kestosa dado en g/min (RT/H) Relación entre la actividad de transfructosilación e hidrolítica dado por división de la composición de 1-kestosa y fructosa

c) Tiempo de vida media de la enzima 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec libre, inmovilizada y liofilizada:

20 Se evaluó la estabilidad térmica de la enzima libre e inmovilizada en Eupergit, así como de células de *P. pastoris* CIGB 308 inmovilizadas en alginato de calcio, incubando la enzima o el inmovilizado en tampón acetato 0,1 M; pH 5,5; a 30, 35 y 40°C. Se tomaron muestras de cada una de las reacciones a intervalos de 24 horas para 30 °C, 1 hora a 35°C y 20 minutos a 40°C, respectivamente, para ensayar la actividad residual por el

25 método estándar de actividad. Posteriormente, se determinó el tiempo de vida media como el tiempo en que cada uno de los preparados enzimáticos había perdido el 50% de la actividad inicial. Los resultados de la Tabla 5 muestran que los preparados enzimáticos que contienen la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec aislada de las células son mucho más estables que células con actividad 1-SST (SEQ ID NO. 1) inmovilizadas en

30 alginato de calcio.

Por otra parte, inesperadamente, el tiempo de vida media del extracto crudo en solución de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec a 30°C, en condiciones no reactivas, es de 1432 horas. Este tiempo supera, en más de 100 veces, los tiempos de vida media reportados hasta la fecha para enzimas 1-SST (SEQ ID NO. 1) de plantas.

35

Tabla 5. Tiempo de vida media de diferentes preparados enzimáticos de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, en condiciones no reactivas

Preparado enzimático	Tiempo de vida media (horas)		
	30°C	35°C	40°C

1-SST (SEQ ID NO. 1)rec libre (Extracto crudo)	1432,0	6,1	0,7
Células de <i>P. pastoris</i> CIGB 308 inmovilizadas en alginato de calcio	36,0	4,2	0,3
1-SST (SEQ ID NO. 1)rec inmovilizada en Eupergit	1856,0	12,9	1,6

Un ensayo de termoestabilidad se realizó al preparado enzimático liofilizado. Como resultado, se obtuvo que la preparación sólida tiene un tiempo de vida media superior a 3 años a 30°C.

Ejemplo 9. Transformación de la sacarosa en FOS catalizada por la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec en una reacción discontinua, utilizando un reactor tipo tanque agitado

La cinética de síntesis de FOS catalizada por la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec se ensayó a la concentración de sacarosa de 600 g/L, añadiendo una relación enzima-peso de sustrato de 15 U/g en tampón acetato de sodio 0,1 M; pH 5,5; a 40°C; por 6 horas, en un reactor de 1 L con agitación de 250 rpm. La composición y cuantificación de los azúcares presentes en las muestras, tomadas cada 20 minutos, se determinó por HPLC, de forma similar al Ejemplo 8. La máxima producción de 1-kestosa fue de 320,8 g/L; 53,4% del total de carbohidratos en la mezcla y 90,4% de total de FOS. En la Figura 3 se muestra que esta máxima producción de 1-kestosa se alcanzó entre las 2,7 y 3 horas de reacción, cuando se consumió más del 70% de la sacarosa inicial. En este punto coincide la máxima concentración de 1-kestosa con el inicio de la aparición del tetrasacárido nistosa.

Este hecho resulta ventajoso para el uso de la enzima 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec en la producción de 1-kestosa a gran escala, ya que no se sintetiza nistosa en la reacción de transformación de la sacarosa hasta que no se consume más del 50% de la sacarosa inicial, tal como se aprecia en la Figura 4. Por el contrario, las FTF de hongos acumulan nistosa desde el inicio de la reacción con la aparición de las primeras moléculas de 1-kestosa y también sintetizan el pentasacárido fructosil-nistosa.

Valores y comportamientos similares del curso de transformación de la sacarosa en 1-kestosa se obtuvieron utilizando células con actividad enzimática 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec periplasmática, libres o inmovilizadas en alginato de calcio, y enzima inmovilizada de forma covalente a Eupergit (Sigma) bajo similares condiciones de reacción. En la Tabla 6 se muestra la concentración de FOS obtenidos por diferentes preparados enzimáticos.

Tabla 6. Concentración de FOS sintetizados a las 3 horas de reacción empleando diferentes preparados enzimáticos de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec

FOS sintetizados	1-SST (SEQ ID NO. 1)rec libre	Células inmovilizadas en alginato de calcio	1-SST (SEQ ID NO. 1)rec inmovilizada en Eupergit
FOS totales	354,7 g/L	330,5 g/L	342,2 g/L
1-Kestosa	320,8 g/L (90,5%)	322,1 g/L (97,4%)	318,3 g/L (93,0%)
Nistosa	33,9 g/L (9,5 %)	8,4 g/L (2,6%)	23,9 g/L (7,0%)

La mezcla de reacción de transfructosilación, obtenida al cabo de 3 horas de síntesis, se sometió a un proceso de pasteurización, con lo el cual se inactivó la enzima. Posteriormente, el sirope se sometió a un proceso de pulido, que comenzó con una filtración, seguida de una desmineralización-descolorización, para concluir con una separación cromatográfica por simulación de movimiento del lecho, que durante la elución dio lugar a una corriente rica en FOS, con más de un 90% de 1-kestosa. Esto demuestra la factibilidad técnica de este procedimiento para producir un sirope rico en 1-kestosa, FOS de mayor efecto prebiótico, lo que lo convierte en el de mayor interés comercial.

La factibilidad técnica, a escala industrial, de este procedimiento se confirmó a través del escalado de la reacción de transformación de la sacarosa en 1-kestosa en reactores de 30 y 100 L de capacidad, respectivamente. El escalado de esta operación se realizó por el método basado en el "Principio de Similitud", a partir de la información obtenida en los ensayos realizados en el reactor modelo de 1 L. La concentración de 1-kestosa obtenida en las dos nuevas escalas promedió 322 ± 7 g/L, resultado que no muestra diferencia significativa con los obtenidos en el reactor modelo. Esto a su vez demostró la reproducibilidad, a escalas superiores, de la reacción de transformación de la sacarosa en 1-kestosa, catalizada por la 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, en reactores tipo tanque agitado.

Ejemplo 10. Síntesis de 1-kestosa a partir de la sacarosa en biorreactor de membranas operado de forma semicontinua

Se aplicó el procedimiento descrito en el Ejemplo 9, para la síntesis de 1-kestosa a partir de la sacarosa, mediante el empleo 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec libre en un biorreactor tipo tanque agitado de 1 L de volumen útil, acoplado a su salida a una membrana de ultrafiltración tipo cartucho (Prep/scale TFF-1 30 kDa, Millipore, con área nominal de filtrado de $0,09 \text{ m}^2$), permitiendo la separación de los productos de la reacción de la enzima según se muestra en la Figura 5. Los parámetros utilizados fueron: concentración inicial de enzima fue de 9 000 U/L, concentración inicial de

sacarosa 600 g/L en tampón acetato 0,1 M; pH 5,5; temperatura 40°C, velocidad de agitación 250 rpm, el flujo a la salida del biorreactor que alimentó a la membrana fue de 40 mL/ min. Durante la etapa de síntesis, las corrientes de retenido y permeado a la salida de la membrana retornan al biorreactor enzimático. A las muestras tomadas cada 30 minutos en la corriente de permeado se le determinó el grado de conversión de sacarosa en 1-kestosa, por HPLC, como se describe en los Ejemplos 8 y 9. Transcurridas 3 horas de reacción, se cerró la válvula de recirculación del permeado al biorreactor, se abrió la válvula del tanque colector de FOS que permanecía cerrada, y se reguló la válvula en la corriente de retenido para alcanzar un flujo de permeado de 30 mL/min. Después de 30 minutos, se descargó el 90% del volumen de reacción, momento en el cual se cerró la válvula de salida del permeado al tanque colector, se abrió la de retorno al biorreactor y se reguló la válvula de retenido, de manera que el flujo permeado que retorna al biorreactor sea de 5 mL/min. Seguidamente, se adicionó o cargó el biorreactor con 900 mL de sacarosa 600 g/L; en tampón acetato 0,1 M; pH 5,5. También se adicionaron 180 U de 1-SST (SEQ ID NO. 1)rec, para mantener el mismo tiempo de reacción e igual conversión de 1-kestosa, comenzando así el segundo ciclo de síntesis. Transcurridas 2 horas y 30 minutos de reacción, se procedió a la descarga de los productos de reacción como se realizó en el primer ciclo. Concluida la descarga del 90% del volumen de reacción del segundo ciclo, se cargó nuevamente el biorreactor de la misma manera que se hizo en el segundo ciclo. Estas etapas de reacción-descarga se repiten secuencialmente, hasta completar 10 ciclos de operación, posterior a lo cual se procedió a la etapa de limpieza del BRM. En la Figura 6 se refleja el comportamiento durante los 3 primeros ciclos, y en la Figura 7 se muestra el perfil de productos al concluir cada uno de ellos.

El uso de un BRM operado de forma secuencial mantiene similar productividad a la de un biorreactor tipo tanque agitado de igual capacidad, pero consumiendo 8 veces menos enzima por cantidad de 1-kestosa producida.

Similares concentraciones de 1-kestosa se obtienen para otras condiciones de operación del BRM operado de forma semicontinua. Entre estas condiciones que se pueden variar sin que se afecte el perfil de producto se encuentran la relación enzima-sustrato (2-40 U/g de sacarosa), la concentración de sacarosa 400-800 g/L, la temperatura (30-50°C), el pH (5,0-6,5), siempre que se mantenga que el tiempo de descarga esté entre un 10 y un 20% del tiempo de producción máxima de 1-kestosa. Tiempos de descarga superiores a este rango favorecen la síntesis de la nistosa y la producción de fructosa, en detrimento de la concentración de 1-kestosa.

Con anterioridad a esta invención no existían informes en la literatura que describieran la obtención de 1-kestosa en BRM.

REIVINDICACIONES

METODO DE OBTENCION DE 1-KESTOSA

1. Método de obtención de 1-kestosa a escala industrial que se caracteriza porque la conversión de la sacarosa en 1-kestosa en un biorreactor se realiza mediante el empleo de una fructosiltransferasa (FTF) recombinante, aislada de *Festuca arundinacea*, expresada constitutivamente en una levadura hospedera no sacarolítica.

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

**CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA**

domiciliado (s) Avenida 31 entre 158 y 190, Playa La
en/of Habana 11600, Cuba

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial e Intelectual, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial and Intellectual Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 24 de marzo 2015

En/in La Habana

Por/by Luis Saturnino Herrera Martinez, Director General

Firma/Signature 

CAVELIER

ABOGADOS

Señor Director

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Asunto :Solicitud de patente para **METODO DE OBTENCION DE 1-KESTOSA**
PCT/CU2013/000005
Solicitante :**CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA**

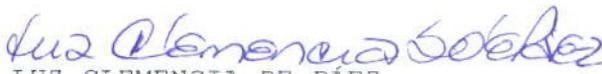
Yo, ADRIANA ZAPATA GIRALDO mayor de edad, vecina de esta ciudad, identificada con cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, en mi calidad de representante legal de la sociedad CAVELIER ABOGADOS domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, en desarrollo de la representación que le fue otorgada por **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA**, confiero poder a los doctores LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén, portadora de la Tarjeta Profesional No. 23.555, JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL, identificado con la cédula de ciudadanía No. 16.209.380 de Cartago (Valle), portador de la Tarjeta Profesional No. 40.119 y EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY identificada con la cédula de ciudadanía No. 52.006.265 de Bogotá, portadora de la Tarjeta Profesional No. 65.794, para presentar la solicitud de registro de la patente indicada en la referencia.

Los apoderados quedan facultados para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes officiosos.

Señor Director,


ADRIANA ZAPATA GIRALDO
C.C. No. 51.680.061 de Bogotá

Acepto:


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ
T.P.A. No. 23.555 del C.S. de la J
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

IAG\SDC\COLO-08972-841-012-0

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3811 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

34



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 102275

Bogotá D.C., Septiembre 17 de 2015 - 11:20:34

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	95568	31/08/2015	1.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	95823	01/09/2015	2.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98499	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98500	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	98502	08/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	100561	14/09/2015	109.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	100562	14/09/2015	109.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101426	16/09/2015	119.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101440	16/09/2015	536.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	101441	16/09/2015	536.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
			\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-223686-00000-0000

Fecha: 2015-09-21 17:30:00 Dep. 2020 DIR NUEVASCF
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 35

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-083396-00004-0000

Fecha: 2015-09-21 17:30:00 Dep. 2020 DIR NUEVASCF
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 35

0010-8972-841-012-0

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Comutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

Art 33 Decisión 486/00

<input type="checkbox"/>	Indicación que se solicita una patente.
<input type="checkbox"/>	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
<input type="checkbox"/>	Descripción de la invención
<input type="checkbox"/>	Dibujos de ser estos pertinentes
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa <input type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>

PATENTE DE INVENCION PCT

MODELO DE UTILIDAD PCT

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

<input type="checkbox"/>	Indicación que se solicita una PCT
<input type="checkbox"/>	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
<input type="checkbox"/>	Dibujos de ser estos pertinentes
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa <input type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>

DISEÑO INDUSTRIAL

(Art. 119 Decisión 486/00)

<input type="checkbox"/>	Indicación que se solicita Diseño industrial
<input type="checkbox"/>	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
<input type="checkbox"/>	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial. Lo muestra del material que incorpora el diseño
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa <input type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>

ESQUEMA DE TRAZADO

(Art. 92 Decisión 486/00)

<input type="checkbox"/>	Indicación que se solicita un esquema de trazado
<input type="checkbox"/>	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
<input type="checkbox"/>	Representación gráfica de un esquema de trazado
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa <input type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

18 (2009-11-18)



No. 15-223686-00000-0000

Fecha 2015-09-21 17:30:00 Dep 2020 DIR NUEVASCF
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 35

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-083396-00004-0000

Fecha 2015-09-21 17:30:00 Dep 2020 DIR NUEVASCF
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 851 DIVISIONAL Folios 35