

SOLUCIÓN DE LACTASA Y PRODUCTO LÁCTEO QUE USA LA MISMA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una solución de lactasa, y leche y productos lácteos que utilizan la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La intolerancia a la lactosa es una afección que presenta diversos síntomas como dolor abdominal y diarrea causada por la lactosa presente en un producto alimenticio tal como un producto lácteo debido a una insuficiencia congénita de lactasa en descomposición. La lactosa es un disacárido compuesto de galactosa y glucosa. Con el fin de tratar la intolerancia a la lactosa, la descomposición previa de la lactosa contenida en la leche o similares a galactosa y glucosa usando la enzima lactasa se
15 lleva a cabo en la industria de fabricación de alimentos.

Las soluciones de lactasa que se utilizan para descomponer la lactosa contenida en la leche o similares se producen convencionalmente cultivando un microorganismo productor de lactasa, extrayendo la lactasa del interior de las células, eliminando los contaminantes derivados del cultivo y purificando la lactasa, seguido por la adición de un estabilizador y luego la esterilización por filtración.

20 La Literatura de Patente 1 (JP S60-18394 B) describe una invención que está dirigida a un método para producir lactasa a partir de un cultivo de una cierta cepa de *Kluyveromyces lactis*. De acuerdo con este método, después de autólisis de las células de levadura, la solución de enzima cruda resultante se hace pasar a través de una columna de DEAE-celulosa, resultando en una separación en dos fracciones activas (lactasas A y B) por elución con un gradiente de concentración de NaCl. La
25 Literatura de Patente 1 describe que estas dos fracciones activas son poco diferentes en propiedades enzimáticas incluyendo termoestabilidad, excepto que tienen una ligera diferencia en la estabilidad de pH, y por lo tanto una preparación enzimática puede incluir una mezcla de estas fracciones activas.

A partir de los resultados del análisis genético de la lactasa derivada de *Kluyveromyces lactis*, la lactasa es un polipéptido que consta de 1,025 aminoácidos y se supone que su peso molecular
30 es de 117,618 (Literatura no de Patente 1).

Se describe adicionalmente en la Literatura de Patente 1 que la lactasa descrita en ella tiene una temperatura óptima de 40 a 50°C y se inactiva 45% después de 10 minutos a 50°C y 100% después de 10 minutos a 55°C a pH 7.0. Sin embargo, no se describe en ella que esta enzima se utilizó realmente para descomponer la lactosa contenida en la leche. Por lo tanto, la Literatura de
35 Patente 1 no describe nada sobre el problema de la disminución de la actividad enzimática cuando se

añade lactasa a una leche de materia prima, en particular la inactivación de la enzima cuando se somete a calor en o superior a 40°C en la leche.

Lista de Citas

5

Documentos de Patente

Literatura de Patente 1: JP S60-18394 B

Literatura de Patente 2: JP 2004-534527 A

Literatura de Patente 3: JP 2009-517061 A

10

Documentos No de Patente

Literatura de no Patente 1: Poch et al., Gene 1992 Sep 1; 118(1):55-63

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15

Problema técnico

La presente invención tiene por objeto proporcionar una solución de lactasa que sea superior en estabilidad térmica.

Solución al problema

20

Los presentes inventores han encontrado que una lactasa tiene una alta estabilidad térmica al aumentar, entre las especies de lactasa, la relación de una fracción de lactasa que forma una banda a aproximadamente 120 kDa sobre electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), dando lugar a la terminación del presente invención.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporcionan aquí:

25

[1] Una solución de lactasa que comprende una fracción de lactasa que tiene un peso molecular de aproximadamente 120 kDa medido por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS en una relación de 20% o más;

30

[2] La solución de lactasa de acuerdo con [1], en donde la suma de la relación de la fracción de lactasa de 120 kDa y una relación de una fracción de lactasa que tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa medida por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS es del 30% más;

[3] La solución de lactasa de acuerdo con [1], en donde una relación de una fracción de lactasa que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa medida mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS es de 70% o menos;

35

[4] La solución de lactasa de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], en donde un valor obtenido al dividir la suma de la relación de la fracción de lactasa de aproximadamente 120 kDa y la

relación de la fracción de lactasa de aproximadamente 80 kDa por la relación de la fracción de lactasa que tiene el peso molecular de aproximadamente 50 kDa basado en la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS es de 0.5 o más;

5 [5] La solución de lactasa de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], para su uso en la producción de productos lácteos;

[6] Un producto lácteo que contiene la solución de lactasa de acuerdo con cualquiera de [1] a [5];

10 [7] Un método para tratar una leche de materia prima, que incluye la adición a una leche de materia prima de la solución de lactasa de acuerdo con cualquiera de [1] a [5], y la descomposición de lactosa contenida en la leche de la materia prima a 1 a 60°C;

[8] Un método para producir una solución de lactasa, que incluye una etapa de cultivo en la que se cultiva un microorganismo, una etapa de recolección en la que la lactasa se recolecta del producto de cultivo obtenido en la etapa de cultivo y
15 una etapa de purificación en la que la lactasa recogida en la etapa de recolección se purifica, en donde

La etapa de purificación incluye uno o más ciclos de:

una etapa en la que se llevan a cabo un tratamiento de remoción de sales y un tratamiento de desalación;

20 [9] El método para producir la solución de lactasa de acuerdo con [8], en donde el tratamiento de remoción de sales incluye

una etapa de saturación en la que a la lactasa recolectada se añade un agente de remoción de sales hasta un grado de saturación de 10 a 90%, y

25 una etapa de mantenimiento en la que después de la etapa de saturación, se deja reposar la lactasa a una temperatura de 4 a 40°C durante un período de 1 a 80 horas; y

[10] El método para producir la solución de lactasa de acuerdo con [8] o [9], en donde el tratamiento de remoción de sales se lleva a cabo a pH 4 a 9.

Efectos ventajosos de la invención

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una solución de lactasa en la que la actividad para descomponer lactosa apenas se reduce incluso cuando se añade a una leche de materia prima y se somete a una carga térmica de 40°C o superior.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados de SDS-PAGE de diversas soluciones de lactasa. Carril 1: ejemplo 1-1, carril 2: ejemplo 1-2, carril 3: ejemplo comparativo 1-1, carril 4: ejemplo comparativo 1-2, carril 5: ejemplo comparativo 2, carril 6: ejemplo comparativo 3, y carril M: patrones de peso molecular. Los carriles 1 y 2 y los carriles 3 y 4 muestran los resultados de diferentes lotes de soluciones de lactasa.

Las figuras 2A y 2B muestran los resultados de SDS-PAGE (figura 2A) y Western blot (figura 2B) de reacciones de descomposición de lactosa en las que se añadieron soluciones de lactasa a leche de materia prima a 43°C durante 2 horas. En cada una de las figuras, el carril 1: ejemplo 1-1, carril 2: ejemplo 1-2, carril 3: ejemplo comparativo 1-1, carril 4: ejemplo comparativo 1-2, carril 5: ejemplo comparativo 2, carril 6: ejemplo comparativo 3, y carril M: patrones de peso molecular.

La figura 3A representa gráficos que muestran cambios en el tiempo en la cantidad de lactosa durante la reacción en la que se añadió una disolución de lactasa a la leche de materia prima a 37, 40, 43, 46 y 49°C para descomponer la lactosa contenida en la misma. En los gráficos se representan los resultados con □ para el ejemplo 1, ○ para el ejemplo comparativo 1, ▲ para el ejemplo comparativo 2 y △ para el ejemplo comparativo 3.

La figura 3B representa gráficos que muestran cambios en el tiempo en el porcentaje de descomposición de lactosa durante la reacción en la que se añadió una solución de lactasa a la leche de materia prima a 37, 40, 43, 46 y 49°C para descomponer la lactosa contenida en la misma. En los gráficos se representan los resultados con □ para el ejemplo 1, ○ para el ejemplo comparativo 1, ▲ para el ejemplo comparativo 2 y △ para el ejemplo comparativo 3.

La figura 4 muestra los resultados de SDS-PAGE de soluciones de lactasa que tienen diferentes relaciones de la fracción de lactasa de 120 kDa. Carril 1: ejemplo 1-1, carril 2: ejemplo 2, carril 3: ejemplo 3, carril 4: ejemplo 4, carril 5: ejemplo 5, carril 6: ejemplo comparativo 1, y carril M: patrones de peso molecular.

Las figuras 5A y 5B representan gráficos que muestran los cambios en el tiempo en la cantidad (figura 5A) y el porcentaje de descomposición (figura 5B) de lactosa durante la reacción en la que una solución de lactasa que tiene una relación diferente de la fracción de lactasa de 120 kDa se añadió a leches de materia prima a 49°C para descomponer la lactosa que contiene. En los gráficos se representan los resultados con □ para el ejemplo 1, ◆ para el ejemplo 2, ▲ para el ejemplo 3, × para el ejemplo 4, * para el ejemplo 5 y ○ para el ejemplo comparativo 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La lactasa que se utiliza en la presente invención es una de las lactasas derivadas de levaduras (del género *Kluyveromyces*). La mayoría de estas lactasas son las llamadas lactasas neutras que tienen un pH óptimo que es de pH = 6 a pH = 8. Las levaduras productoras de lactasa del género *Kluyveromyces* son, por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces marxianus*.

Una solución de lactasa de la presente invención tiene deseablemente una actividad de lactasa de 10 a 100,000 NLU/g. "NLU" significa Unidad de Lactasa Neutra. El método para medir la actividad de la lactasa es el siguiente: La actividad enzimática de una solución de lactasa se determina por hidrólisis de un sustrato o-nitrofenil-β-galactopiranosido (ONPG) en o-nitrofenol y galactosa. La reacción se detiene por adición de carbonato de sodio. Dado que el o-nitrofenol resultante es de color amarillo en un medio alcalino, se usan cambios en la absorbancia para determinar la actividad enzimática (expresada como NLU/g). Este procedimiento se publica en Food Chemicals Codex (FCC), 4a ed., 1 de julio de 1996, pp. 801-802, Actividad de lactasa (neutra) (β-galactosidasa).

Una solución de lactasa de la presente invención puede ser una que incluya una lactasa que ha sido recolectada de un microorganismo por el método siguiente y purificada.

El método para producir una solución de lactasa de la presente invención sufre cuatro etapas, es decir;

- (1) una etapa en la que se cultiva un microorganismo,
- (2) una etapa en la que la lactasa se recolecta del microorganismo,
- (3) una etapa en la que la lactasa se purifica, y
- (4) una etapa en la que se ajusta la actividad de lactasa de la solución de lactasa.

A continuación se ofrece una explicación detallada de estos cuatro pasos.

Con respecto a (1) una etapa en la que se cultiva un microorganismo, esta etapa puede realizarse empleando un medio conocido y usando una cepa microbiana conocida. Las condiciones de cultivo también se conocen, y se pueden seleccionar según sea necesario y según sea apropiado.

Con respecto a (2) una etapa en la que la lactasa se recolecta del microorganismo, es necesario que esta etapa incluya una etapa de extracción de la lactasa del microorganismo cuando se trata de una enzima intracelular. La etapa de extracción no está limitada en particular, siempre que se utilice un método, que sea capaz de transferir la lactasa al exterior de la célula, y se pueden usar métodos de extracción conocidos. Por otro lado, si la lactasa es una enzima que se secreta fuera de la célula de un microorganismo modificado por transferencia génica, mutagénesis o lo similar, entonces

su medio cultivado contendrá la lactasa y, por lo tanto, no se requiere la etapa de extracción.

Con respecto a (3) una etapa en la que la lactasa se purifica, esta etapa es importante para obtener una solución de lactasa de la presente invención. Las literaturas de patentes 1, 2 y 3 son comunes porque cada una de estas publicaciones utiliza procedimientos cromatográficos para purificar una solución de lactasa. Estos procedimientos cromatográficos avanzan en la purificación de la lactasa, haciendo posible que la solución de lactasa tenga una actividad de lactasa incrementada. Sin embargo, como se describe a continuación, cuando procedimientos cromatográficos, tales como partición o cromatografía de tamizado molecular, cromatografía de adsorción, o cromatografía de intercambio iónico, se usan para purificar la lactasa, resultó que la lactasa original de 120 kDa se descomponía en dos especies de lactasa de 80 kDa y 50 kDa. Ambas especies de lactasa que tienen tales pesos moleculares exhiben actividad de lactasa; sin embargo, la descomposición de la lactasa original conduce especialmente a un incremento en la relación de una fracción de lactasa de 50 kDa, reduciendo la estabilidad térmica de la lactasa y como resultado, dando lugar a un problema que resulta difícil que la descomposición de la lactosa proceda a temperaturas relativamente altas.

La lactasa de la presente invención se puede obtener utilizando tratamientos de remoción de sales y desalación en la etapa de purificación. Por ejemplo, la lactasa de la presente invención se obtiene precipitando la lactasa por remoción de sales, seguido por la recolección y re-disolución del precipitado, y luego desalando la lactasa para eliminar las sales contenidas en la misma. La remoción de sales de la lactasa, y la recolección y re-disolución y desalación del precipitado pueden llevarse a cabo de una manera continua. También es posible utilizar en combinación otros procedimientos de purificación, que incluyen cromatografía y tratamientos con carbón activo, siempre que se obtenga la lactasa de la presente invención.

La razón por la cual la especie de lactasa de 120 kDa no se descompone por remoción de sales se asume que es debido que la remoción de sales permite que la lactasa precipite como macromoléculas y se vuelva insoluble, y por lo tanto la lactasa tiene una reactividad disminuida a la descomposición.

Los agentes de remoción de sales para remover sales de la lactasa incluyen sulfato de amonio, sulfato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, citrato de sodio, cloruro de sodio y cloruro de potasio. Estos agentes pueden usarse solos en combinación de dos o más.

Cuando se añade sulfato de amonio como agente de remoción de sales a una solución que contiene lactasa, se le añade sulfato de amonio, preferiblemente hasta un grado de saturación de 10 a 90%, más preferiblemente de 30 a 70%. En los casos en los que se utiliza un agente de remoción de sales diferente, se puede añadir en una cantidad que corresponde a la del sulfato de amonio añadido.

La lactasa se puede precipitar fuera de una solución que contiene lactasa mediante la

adición de un agente de remoción de sales tal como sulfato de amonio. Es preferible que desde la adición de un agente de remoción de sales hasta cuando la lactasa se ha precipitado, la solución que contiene lactasa se deje reposar a una temperatura de 1 a 40°C durante un período de 1 a 80 horas. Para las condiciones de pH durante este periodo, es preferible un pH de 4 a 9. Además
 5 preferiblemente, la solución que contiene lactasa se deja reposar a una temperatura de 4 a 25°C (temperatura ambiente) durante un período de 1 a 48 horas a un pH de 5 a 8. El límite inferior de las condiciones de temperatura puede ajustarse a una temperatura a la cual la solución que contiene lactasa no se solidifica. El líquido del cual la lactasa se ha precipitado y el precipitado que contiene lactasa se separan sólido-líquido por filtración, y después la lactasa en la forma de sólido se disuelve en
 10 agua, regulador de pH, o lo similar, y se desala por diálisis o por concentración de ultrafiltración.

Con respecto a (4) una etapa en la que se ajusta la actividad de lactasa de la solución de lactasa, no hay limitación, siempre que se pueda ajustar la actividad de lactasa de la solución de lactasa. Por ejemplo, esta etapa incluye la adición de agua, la adición de soluciones acuosas que contienen sales, la adición de estabilizante y lo similar.

15 Una solución de lactasa de la presente invención también se puede obtener al mezclar una solución de lactasa comercialmente disponible y una solución de lactasa obtenida por el método descrito anteriormente, siempre y cuando las relaciones de fracciones de lactasa con pesos moleculares especificados medidos por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS se cumplan que estén dentro de relaciones particulares.

20 El peso molecular de las especies de lactasa en una solución de lactasa puede determinarse aproximadamente mediante SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida al 10%. Por ejemplo, una muestra de una solución de lactasa se diluye en agua purificada, si es necesario, y se mezcla 1:1 con un regulador de pH de muestra SDS-PAGE, y la mezcla se calienta a 95 grados durante 5 minutos para preparar una muestra de electroforesis. Un gel de acrilamida al 10% se carga con
 25 estándares y la muestra de electroforesis preparada, y se somete a electroforesis. Los estándares utilizan, por ejemplo, los estándares BIO-RAD # 161-0313 (pre-teñidos). El gel después de la electroforesis se somete a tinción de proteína con una solución de tinción CBB (APRO SP-4010).

Después de someter una solución de lactasa de la presente invención a tinción con SDS-PAGE y CBB, el gel se seca usando el kit de secado de poliacrilamida TEFCO (nombre comercial de
 30 Clear Dry Solution). El gel seco se explora como una imagen a escala de grises con un escáner EPSON GT-X820, en el que se determinan las densidades de bandas de proteínas teñidas (que corresponden a cantidades de proteínas) usando el software Image J (NIH, Bethesda, MD).

Una solución de lactasa de la presente invención tiene una relación elevada de una fracción de lactasa que tiene un peso molecular de aproximadamente 120 kDa cuando se determina
 35 mediante el método descrito anteriormente. En la presente invención, una "fracción de lactasa que

tiene un peso molecular de aproximadamente 120 kDa medido por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS" se refiere a una fracción de una especie de lactasa que forma una banda situada en una posición que corresponde a aproximadamente 120 kDa (o en un intervalo entre aproximadamente 100 kDa y aproximadamente 150 kDa), con relación a las movilidades de los estándares de peso molecular, después de que la electroforesis se realiza usando el método descrito anteriormente.

Para una solución de lactasa de la presente invención, la relación de una fracción de lactasa de aproximadamente 120 kDa determinada por el software Image J (NIH, Bethesda, MD) después de la tinción con SDS-PAGE y CBB es 20% o más, preferiblemente 50% o más, además preferiblemente 80% o más, y lo más preferiblemente 90% o más. Su límite superior no está particularmente limitado, pero, por ejemplo, es 100%. La relación de dicha fracción de lactasa se calcula mediante el método descrito a continuación.

Después de la tinción con SDS-PAGE y CBB, se utiliza el software Image J (NIH, Bethesda, MD) para cuantificar las densidades de bandas de proteínas teñidas para calcular la relación de bandas de proteínas teñidas correspondientes a aproximadamente 120 kDa sobre la base de las bandas principales totales como 100%, que incluyen bandas de proteínas teñidas correspondientes a aproximadamente 120 kDa (100 a 150 kDa), aproximadamente 80 kDa (80 a 100 kDa), aproximadamente 50 kDa (49 a 54 kDa) y aproximadamente 30 kDa (28 a 32 kDa). Los valores enumerados en las reivindicaciones de la presente solicitud son valores calculados cuando el total de estas cuatro bandas de proteína teñidas se fija en 100% a menos que se recite específicamente.

Para una solución de lactasa de la presente invención, la suma de la relación de una fracción de lactasa de aproximadamente 80 kDa calculada usando el método descrito anteriormente y la relación de la fracción de lactasa de 120 kDa anteriormente descrita, preferiblemente es 30% o más, más preferiblemente 60% o más, además preferiblemente 90% o más. Su límite superior no está particularmente limitado, pero por ejemplo, es 100%.

La descomposición de una especie de lactasa de aproximadamente 120 kDa (que se puede denominar en lo sucesivo lactasa I) genera una especie de lactasa de aproximadamente 80 kDa (que se puede denominar en lo sucesivo lactasa II), y la descomposición de la lactasa I o II genera una especie de lactasa de aproximadamente 50 kDa (que se puede denominar en lo sucesivo lactasa III).

Las lactasas I y II en una solución de lactasa tienen actividad de lactasa y resistencia al calor. La lactasa III tiene actividad de lactasa, pero es pobre en resistencia al calor. Cualquiera de estas fracciones de lactasa tiene actividad de lactasa comparable.

Puesto que la lactasa II es un producto de descomposición de la lactasa I, es preferible que la relación de la lactasa I en una solución de lactasa sea mayor que la de la lactasa II desde el punto de vista de la resistencia al calor.

La relación de lactasa III en una solución de lactasa preferiblemente es 70% o menos, más preferiblemente 40% o menos, además preferiblemente 10% o menos. Su límite inferior no está particularmente limitado, pero por ejemplo es 0%.

El valor obtenido al dividir la suma de las relaciones de las lactasas I y II por las relaciones de la lactasa III es preferiblemente 0.5 o más, más preferiblemente 1.0 o más, además preferiblemente 5.0 o más. Cuando el valor es inferior a 0.5, existe una tendencia a que la solución de lactasa exhiba una resistencia al calor insuficiente. Su límite superior no está limitado porque es más preferible que la solución de lactasa no contenga lactasa III, es decir, cantidades cero de lactasa III.

Una leche de materia prima es un sujeto al que se debe añadir la solución de lactasa. En la presente invención, se pueden emplear leches de materia prima conocidas. Las leches de materia prima también incluyen las antes y después de la pasteurización. Cualquier leche de materia prima puede ser utilizada, siempre y cuando se obtenga usando una leche. Los ingredientes que componen las leches de materias primas son el agua, leche de materia prima, leche pasteurizada, leche desgrasada, leche entera seca, leche seca sin grasa, suero de leche, mantequilla, crema, concentrados de proteína de suero de leche (WPC), aislados de proteína de suero de leche (WPIs), α (alfa)-La, β (beta)-Lg, y lo similar.

La lactosa contenida en una leche de materia prima puede descomponerse mediante la adición a la misma de una solución de lactasa de la presente invención. La temperatura de descomposición es de 1 a 60°C y el tiempo de descomposición es de 10 minutos a 24 horas.

Los ejemplos de usos específicos de una solución de lactasa incluyen, por ejemplo, uso en la producción de una leche fermentada. Los métodos para producir una leche fermentada descompuesta en lactosa incluyen: por ejemplo, 1. un método en el que se añade una solución de lactasa a una leche antes de la pasteurización, para descomponer de este modo la lactosa, seguido de la pasteurización por calor de la leche y la inactivación concomitante de la lactasa, seguido por la fermentación de la leche tratada (JP Hei 5-501197 A); 2. un método en el que se añade una solución de lactasa a una leche pasteurizada, con lo que se descompone la lactosa, seguido de un tratamiento térmico para inactivar la lactasa, seguido de la fermentación de la leche tratada; 3. Un método en el que la lactosa en una leche se descompone mediante una lactasa inmovilizada, seguido por la fermentación de la leche tratada (JP S46-105593 A y S59-162833 A); y 4. un método en el que una materia prima que ha sido previamente sometida a la descomposición o eliminación de la lactosa se utiliza como leche pasteurizada, seguida de fermentación.

Una solución de lactasa de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuada para su uso en la producción de productos lácteos. Aquí, los productos lácteos se refieren a los helados, las leches como leche de larga vida, yogur, crema fresca, crema agria, queso y otros.

En particular, una solución de lactasa de acuerdo con la presente invención se puede usar preferiblemente cuando se expone a una carga térmica en o superior a 40°C. Dicho uso incluye, por ejemplo, el uso en la producción de yogures.

5

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

1. Producción de soluciones de lactasa

10

Se esterilizó a presión (y tuvo un pH de 5.5 después de la esterilización) un medio líquido que contenía 7% de licor de maíz y 2% de lactosa, y se inoculó con *Kluyveromyces lactis* No. 013-2 (cepa ATCC 8585), que se cultivó a 30°C durante 24 horas bajo aireación a 12000 l/min. Después de completar el cultivo, el caldo de cultivo se dejó reposar durante 4 horas con enfriamiento. A continuación, se retiró el sobrenadante de la parte superior del tanque de fermentación para obtener 1500 kg de células, que se habían agregado y se habían asentado en el fondo del tanque. A continuación, se lavaron 1500 g de células así obtenidas con agua del grifo. Después se añadieron 80 ml de tolueno y se mezclaron con las células, seguido de la adición de 1500 ml de regulador de pH de fosfato 0.05 M (pH 7.0). La mezcla se agitó para formar una suspensión homogénea, que luego se dejó reposar, bajo sellado hermético, a 30°C durante 15 horas para autólisis celular.

20

El producto de autólisis resultante se centrifugó para obtener 2500 ml de sobrenadante, al que se añadió un volumen igual de acetona fría, y la mezcla se dejó en reposo durante una noche. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación y luego se disolvieron en 600 ml de agua del grifo para preparar una solución de enzima antes de la concentración.

25

A la solución enzimática (600 ml) antes de la concentración, con enfriamiento a 4°C, se añadió polvo de sulfato de amonio en porciones durante 60 minutos para preparar una solución acuosa que estaba saturada al 50% con la misma. La solución acuosa se dejó reposar (en quietud) a 4°C durante 80 horas para permitir que la lactasa se estabilizara, seguido por separación sólido-líquido por filtración para recoger la lactasa en forma de sólido. La lactasa se volvió a disolver en 600 ml de agua del grifo, seguida por la concentración de ultrafiltración. A la solución de lactasa desalada resultante se añadió agua del grifo, seguido por la adición de glicerina hasta una concentración final del 50% para preparar una solución de lactasa (5,000 NLU/g) del ejemplo 1.

30

EJEMPLO 2

La solución de lactasa del ejemplo 1 y una solución de lactasa del ejemplo comparativo 1 que se describe a continuación se mezclaron en una proporción en peso de 80: 20 para preparar una solución de lactasa (5,000 NLU/g) del ejemplo 2.

EJEMPLO 3

La solución de lactasa del ejemplo 1 y una solución de lactasa del ejemplo comparativo 1 que se describe a continuación se mezclaron en una proporción en peso de 60: 40 para preparar una solución de lactasa (5,000 NLU/g) del ejemplo 3.

EJEMPLO 4

La solución de lactasa del ejemplo 1 y una solución de lactasa del ejemplo comparativo 1 que se describe a continuación se mezclaron en una proporción en peso de 40: 60 para preparar una solución de lactasa (5,000 NLU/g) del ejemplo 4.

EJEMPLO 5

La solución de lactasa del ejemplo 1 y una solución de lactasa del ejemplo comparativo 1 que se describe a continuación se mezclaron en una proporción en peso de 20: 80 para preparar una solución de lactasa (5,000 NLU/g) del ejemplo 5.

EJEMPLO COMPARATIVO 1

Se usó una preparación de lactasa comercialmente disponible, que está disponible como nombre comercial de "GODO-YNL 2SS" (fabricado por GODO SHUSEI CO, LTD., 5000 NLU/g) para preparar una solución de lactasa del ejemplo comparativo 1.

EJEMPLO COMPARATIVO 2

Se usó una preparación de lactasa comercialmente disponible, que está disponible como nombre comercial de "MAXILACT LG 5000" (fabricado por DSM, 5000 NLU/g), para preparar una solución de lactasa del ejemplo comparativo 2.

EJEMPLO COMPARATIVO 3

Se usó una preparación de lactasa comercialmente disponible, que está disponible como nombre comercial de "MAXILACT LGX 5000" (fabricado por DSM, 5000 NLU/g), para preparar una solución de lactasa del ejemplo comparativo 3.

2. Electroforesis de soluciones de lactasa

Cada una de estas soluciones de lactasa se diluyó en agua de mili-Q para tener una actividad de lactasa de 10 NLU/g y se mezcló 1:1 con un regulador de pH de muestra SDS-PAGE (Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, azul de bromotimol 0.0125% 20% de glicerina, 2.5% de SDS, 2.5% de 2-mercaptoetanol), y la mezcla se calentó a 95°C durante 5 minutos para preparar una muestra de electroforesis. Se cargó un gel de acrilamida al 10% (gel de apilamiento al 4%, un espesor de 1 mm, una distancia de electroforesis de 50 mm) con patrones de peso molecular y las muestras preparadas y se sometió a electroforesis en un aparato de electroforesis de Marisol Industry, que se ejecutó con una corriente constante de 10 mA en el gel de apilamiento y 20 mA en el gel de separación hasta que el frente de ejecución alcanzó casi el extremo inferior del gel. Los estándares de peso molecular (carril M) utilizaron los estándares BIO-RAD # 161-0313 (pre-teñidos). El gel después de la electroforesis se sometió a tinción de proteína durante 1 hora con una solución de tinción CBB (APRO SP-4010).

Los resultados se muestran en la figura 1. Para la solución de lactasa del ejemplo 1 (carriles 1 y 2), sólo se observó una banda principal con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa. Por el contrario, para la solución de lactasa del ejemplo comparativo 1 (carriles 3 y 4), una banda con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa casi desapareció, mientras que tres bandas con pesos moleculares de aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 30 kDa fueron detectados como bandas principales. Para las soluciones de lactasa de ambos ejemplos comparativos 2 (carril 5) y 3 (carril 6), además de una banda con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa, casi no se observó una banda con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, y se observaron bandas principales a aproximadamente 50 kDa y aproximadamente 30 kDa.

Se detectó actividad de lactasa para las bandas con pesos moleculares de aproximadamente 120 kDa, aproximadamente 80 kDa, y aproximadamente 50 kDa, y no para una banda con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa.

3. Determinación cuantitativa de cada una de las bandas y resultados de la lactasa 1

Las relaciones de las respectivas bandas de lactasa en el gel después de la

electroforesis se calcularon basándose en su determinación cuantitativa usando el método descrito anteriormente. Los resultados se muestran en el cuadro 1. El cuadro 1 enumera los valores calculados para cuatro bandas principales de lactasa en base a todas las bandas de proteínas. Además, el cuadro 2 muestra los resultados de las relaciones calculadas de las respectivas bandas de lactasa en base a sólo cuatro bandas principales de lactasa en total. En los cuadros 1 a 4, la razón por la que la suma de los valores para las soluciones de lactasa de los ejemplos y ejemplos comparativos no es 100 es que sus respectivas mediciones obtenidas se redondearon a un decimal.

Aunque no se muestran en los cuadros 1 y 2, cuando las fracciones A y B obtenidas repitiendo el ejemplo 1 de la Literatura de Patente 1 se analizaron por electroforesis como en el ejemplo 1 y otras de la presente invención, estas tendieron una tendencia similar a las observadas para los ejemplos comparativos 2 y 3 de la presente invención.

CUADRO 1

	Ejemplo 1-1	Ejemplo 1-2	Ejemplo Comparativo 1-1	Ejemplo Comparativo 1-2	Ejemplo Comparativo 2	Ejemplo Comparativo 3
Aproximadamente 120,000	78.8	76.6	13.0	8.7	3.9	3.5
Aproximadamente 80,000			23.9	14.1	5.3	3.5
Aproximadamente 50,000			25.7	32.6	36.7	37.9
Aproximadamente 30,000			37.5	43.0	53.7	55.1
Otros	21.2	23.5		1.6	0.4	

CUADRO 2

	Ejemplo 1-1	Ejemplo 1-2	Ejemplo Comparativo 1-1	Ejemplo Comparativo 1-2	Ejemplo Comparativo 2	Ejemplo Comparativo 3
Aproximadamente 120,000	100.0	100.0	13.0	8.9	3.9	3.5
Aproximadamente 80,000			23.9	14.3	5.3	3.5
Aproximadamente 50,000			25.7	33.1	36.9	37.9
Aproximadamente 30,000			37.5	43.7	53.9	55.1

4. Electroforesis y análisis western blot de las leches después de la reacción de descomposición de la lactosa

A una leche que había pasado por pasteurización UHT (a 130°C durante 2 segundos) (un nombre comercial de "Meiji Oishii Gyunyu", fabricado por Meiji Co., Ltd.) se añadió la solución de lactasa del ejemplo 1 (correspondiente a los carriles 1 y 2), o el ejemplo comparativo 1 (correspondiente a los carriles 3 y 4), 2 (correspondiente al carril 5), o 3 (correspondiente al carril 6) hasta una concentración final de 0.05% (p/v) y la mezcla se sometió a una reacción de descomposición de lactosa a 43°C durante 2 horas. La solución después de la reacción se diluyó 20 veces (p/v) en agua purificada y se mezcló 1:1 con un regulador de pH de muestra SDS-PAGE, y la mezcla se calentó a 95 grados durante 5 minutos para preparar una muestra de electroforesis. Se cargaron dos geles de acrilamida al 10% con patrones de peso molecular y las muestras de electroforesis preparadas, y se sometieron a electroforesis en paralelo. Los estándares de peso molecular (carril M) utilizaron los estándares BIO-RAD # 161-0313 (pre-teñidos).

Después de la electroforesis, uno de los geles se sometió a tinción de proteína con una solución de tinción de CBB como se describió anteriormente, y el otro a western blotting. Como la membrana de transferencia de Western Blot, se utilizó una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD # 162-0114), y se llevó a cabo Western blotting de manera húmeda. La membrana después de la transferencia se bloqueó con una solución Block Ace (4 g de Block Ace en polvo (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) en 100 ml de agua purificada) y después se lavó con Tween-PBS.

Como el anticuerpo primario, se usó un anticuerpo policlonal anti-lactasa, que se había preparado en casa como se describe a continuación. La SDS-PAGE se realizó usando una alícuota de la solución de lactasa obtenida en el ejemplo 1, y una porción que contenía una banda de lactasa de 120 kDa se cortó del gel y se trituró, y luego se mezcló con Difco Adjuvant, Complete, Freund para hacer una emulsión. La emulsión se inyectó subcutáneamente un total de tres veces a la base de la cola de ratones Balb-C. Después de que se observó un aumento en el título de anticuerpo en suero, se utilizó el sobrenadante obtenido por centrifugación de una muestra de sangre entera recogida como anticuerpo policlonal anti-lactasa. Este anticuerpo era capaz de detectar bandas de lactasa con pesos moleculares de 120, 80 y 50 kDa.

La membrana se sometió a reacción a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución en la que el anticuerpo anti-lactasa se diluyó 1,000 veces en una solución de Block Ace diluida, que era una dilución de 10 veces de la solución de Block Ace en agua purificada. La membrana se lavó cuatro veces con Tween-PBS y luego se sometió a una reacción de temperatura durante 2 horas en una solución en la que un anticuerpo secundario (gort a-ratón IgG(H+L)-HRP, SouthernBiotech, 1034-05) Diluido 5,000 veces en una solución de Block Ace diluida. La membrana se lavó con Tween-PBS, seguido de tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB). Para el sustrato DAB, se usó una

tableta de regulador de pH DAB (MERCK, 1.02924.0001) como se indica.

Los resultados se muestran en las figuras 2A y 2B. En la imagen de tinción de CBB (figura 2A), se observaron casi los mismos resultados independientes de las diferencias de las soluciones de lactasa utilizadas. Por el contrario, los resultados de Western blot (figura 2B) muestran las diferentes bandas debido a las diferencias de las soluciones de lactasa utilizadas, como en el caso de las soluciones de lactasa antes de la reacción. Es decir, para la solución de lactasa del ejemplo 1, sólo se observó una banda principal con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa; para la solución de lactasa del ejemplo comparativo 1, una banda con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa casi desapareció, mientras que dos bandas con pesos moleculares de aproximadamente 80 kDa y aproximadamente 50 kDa se detectaron como bandas principales. Para la solución de lactasa del ejemplo comparativo 2 ó 3, además de una banda con un peso molecular de aproximadamente 120 kDa, casi no se observó una banda con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa y se observó la banda principal en aproximadamente 50 kDa.

Con base en lo anterior, no se encontraron cambios en los pesos moleculares y en las relaciones de las fracciones de peso moleculares de las especies de lactasa contenidas en cada una de las soluciones de lactasa antes y después de algunas reacciones de descomposición de lactosa.

5. Prueba de descomposición de lactosa 1

A una leche que había pasado por pasteurización UHT (a 130°C durante 2 segundos) se añadieron cada una de las soluciones de lactasa del ejemplo 1 y de los ejemplos comparativos 1, 2 y 3 hasta una concentración final de 0.05% (p/v) (2.5 NLU por 100 ml de leche), y la mezcla se sometió a una reacción de descomposición de lactosa a 49°C, 46°C, 43°C, 40°C y 37°C. El contenido de lactosa en las soluciones de reacción antes y durante el tiempo durante la reacción de descomposición de lactosa se determinó mediante HPLC (usando una columna Transgenomic CARBOSep CHO620 en el sistema HPLC Waters Alliance, temperatura de la columna: 85°C, solvente: H₂O, caudal: 0.5 ml/min, detector: detector RI Waters 2414). El porcentaje de descomposición de lactosa se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: Porcentaje de descomposición de lactosa (%) = 100 - [(el contenido de lactosa en la leche después de haber sido sometida a la reacción de descomposición de lactosa usando la solución de lactasa de un ejemplo o ejemplo comparativo) / (el contenido de lactosa en la leche antes de ser sometido a la reacción de descomposición de lactosa usando la solución de lactasa del ejemplo o ejemplo comparativo) x 100].

Los resultados se muestran en las figuras 3A y 3B. Las figuras 3A y 3B muestran los resultados de cambios en el tiempo en el contenido de lactosa y en el porcentaje de descomposición de lactosa, respectivamente. Después de 2 horas de la reacción de descomposición de lactosa a 37°C, no se observaron diferencias en el porcentaje de descomposición de lactosa para la solución de lactasa

del ejemplo 1 o ejemplo comparativo 1, 2 ó 3, pero se encontró una tendencia a que, como la temperatura de reacción se aumentó, la solución de lactasa del ejemplo 1 dio el mayor porcentaje de descomposición de lactosa, seguido por el ejemplo comparativo 1, y la solución de lactasa del ejemplo comparativo 2 ó 3 dio el porcentaje más bajo de descomposición de lactosa. Como se ha mencionado, se demostró que también cuando la temperatura de reacción se incrementaba, la solución de lactasa de la presente invención no mostraba inactivación de la lactasa y por lo tanto una mayor estabilidad térmica. La solución de lactasa del ejemplo 1 también permite una descomposición más eficaz de lactosa en un tiempo de reacción más corto aumentando la temperatura de reacción. También para las soluciones de lactasa de diferentes lotes de acuerdo con la presente invención, se verificó la reproducibilidad de estos hallazgos.

Dado que los pesos moleculares de las fracciones de lactasa principales en las respectivas soluciones de lactasa no cambiaron entre antes y después de la reacción de descomposición de lactosa, la disminución en el porcentaje de descomposición de lactosa es atribuible a la disminución de la actividad de lactasa durante la reacción. También se encontró que cuanto mayor es el contenido de la fracción de lactasa de 120 kDa, mayor es el porcentaje de descomposición de lactosa en las reacciones a 40°C o por encima.

6. Exámenes con soluciones mixtas de lactasa

Se hicieron exámenes de las soluciones de lactasa de los ejemplos 2 a 5, que eran soluciones de lactasa obtenidas mezclando las soluciones de lactasa del ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1 en las relaciones descritas anteriormente.

6.1 Determinación cuantitativa de las bandas y resultados de la lactasa 2

Para las soluciones de lactasa de los ejemplos 2 a 5, se llevó a cabo la electroforesis por el método descrito anteriormente, seguido por determinación cuantitativa de bandas de lactasa. Los resultados de la electroforesis de las soluciones de lactasa se muestran en la figura 4 y los resultados de la determinación cuantitativa de las bandas de lactasa se muestran en el cuadro 3. El cuadro 3 lista los valores para cuatro bandas principales de lactasa cuando todas las bandas de proteínas se usaron para el cálculo. Además, el cuadro 4 muestra los resultados cuando sólo se utilizaron las cuatro bandas principales de lactasa para calcular las relaciones de las respectivas bandas de lactasa. Para la comparación, los cuadros 3 y 4 incluyen los resultados de la electroforesis y la determinación cuantitativa que se llevaron a cabo simultáneamente para las soluciones de lactasa del ejemplo 1 y el ejemplo comparativo 1.

CUADRO 3

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo Comparativo 1
Aproximadamente 120,000	82.8	77.8	66.5	44.3	23.8	5.5
Aproximadamente 80,000		1.9	2.2	6.3	7.7	12.9
Aproximadamente 50,000		11.7	16.3	26.3	32.7	38.8
Aproximadamente 30,000		4.9	13.8	21.9	32.5	40.8
Otros	17.2	3.7	1.2	1.1	3.4	2.0

CUADRO 4

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo Comparativo 1
Aproximadamente 120,000	100.0	80.8	67.3	44.8	24.6	5.7
Aproximadamente 80,000		2.0	2.2	6.4	7.9	13.1
Aproximadamente 50,000		12.1	16.5	26.6	33.8	39.6
Aproximadamente 30,000		5.1	14.0	22.2	33.6	41.7

Prueba de descomposición de lactosa 2

Las soluciones de lactasa de los ejemplos 1 a 5 y el ejemplo comparativo 1 se usaron para una reacción de descomposición de lactosa a 49°C mediante la prueba de descomposición de lactosa descrita anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5A y 5B.

Las figuras 5A y 5B muestran los resultados de los cambios en el tiempo en el contenido de lactosa y en el porcentaje de descomposición de lactosa, respectivamente. Se encontró que la descomposición de lactosa aumentaba con una relación creciente de la banda de lactasa de aproximadamente 120 kDa.

Por lo tanto, se puede decir a partir de los resultados anteriores que una solución de lactasa en la que la relación de la banda de lactasa principal a aproximadamente 120 kDa sobre SDS-PAGE es del 20% o más tiene una mayor resistencia al calor que la que da cualquiera de las bandas principales de lactasa con pesos moleculares de aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 50 kDa, y aproximadamente 30 kDa en SDS-PAGE.