



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 251 301**

⑫ Número de solicitud: 200402175

⑬ Int. Cl.:
C12N 9/10 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **11.09.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2006**

Fecha de la concesión: **24.05.2007**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2007**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

⑲ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad del País Vasco y
Universidad de Cantabria**

⑳ Inventor/es: **López García, Paloma;
Werning, M^a Laura;
Irastorza Iribas, Ana;
Dueñas Chasco, M^a Teresa;
Ibarburu López, Idoia y
Navas Méndez, Jesús**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Secuencias, vectores y células GTF y sus aplicaciones en el sector alimentario.**

㉓ Resumen:

Secuencias, vectores y células GTF y sus aplicaciones en el sector alimentario.

Esta invención presenta secuencias, vectores y microorganismos GTF que están constituidas o comprenden el gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6 que codifica una glicosiltransferasa localizada en la membrana y que permite la producción de exopolisacáridos del tipo β -glucano por sobreexpresión de dicho gen recombinante. El hecho de que sea un único gen el implicado en la síntesis de este enzima facilita la optimización de las condiciones de expresión que permitirán la producción de β -glucanos a escala industrial. Estos polímeros, que pueden ser utilizados como aditivos en numerosos alimentos, poseen además propiedades beneficiosas para la salud humana. Por otro lado, estos microorganismos GTF transformados pueden ser utilizado en procesos de fermentación de alimentos como productos lácteos, bebidas alcohólicas y avena.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Secuencias, vectores y células GTF y sus aplicaciones en el sector alimentario.

5 Sector de la técnica

Biotecnología para el sector alimentario. Más concretamente, fermentación de alimentos y bebidas, y en concreto obtención de microorganismos productores de exopolisacáridos (β -glucanos) y de aditivos alimentarios.

10 Estado de la técnica

Los exopolisacáridos (EPS) secretados por diversas bacterias tienen un papel importante como factores de adherencia, en las interacciones de las bacterias con las plantas como moléculas señalizadoras o como agentes protectores frente a situaciones de estrés o infecciones por fagos (van Kranenburg y cols. (1999) Curr. Opin. Biotech. 10: 498-504). Los EPS son producidos tanto por bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. Algunos de estos polímeros poseen propiedades únicas que les hacen idóneos para ser utilizados como agentes estabilizadores, espesantes, gelificadores y emulsionantes. Se utilizan como aditivos en la fabricación de numerosos alimentos como derivados lácteos (yogures, batidos y helados), zumos y preparados a base de cereales. Entre los EPS más representativos producidos por las bacterias Gram-negativas podemos citar el xantano, producido por *Xanthomonas campestris* y empleado en cosmética en forma de goma como espesante, estabilizador y agente de suspensión (Becker y cols. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 145-152). También el acetano, producido por *Acetobacter xylinum* es utilizado para la producción de sucedáneos de la nata y del vinagre (Sutherland (1998) Trends Biotechnol. 16:41-46). Además, polisacáridos capsulares producidos por *Sphingomonas*, que poseen propiedades reológicas son utilizados como agentes estabilizadores de los alimentos (Sutherland (1998) Trends Biotechnol. 16: 41-46).

Las bacterias Gram-positivas y específicamente las bacterias ácido-lácticas (LAB) producen varios EPS de interés industrial. Un claro ejemplo son los dextranos producidos por *Leuconostoc mesenteroides*, empleados en la síntesis de matrices utilizadas en técnicas de cromatografía, para el recubrimiento de superficies metálicas o para estabilizar jarabes. Además, algunas estirpes de LAB pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* producen EPSs que están siendo utilizadas *in situ* para mejorar la textura de productos fermentados como el yogourt y el queso (de Vos (1999) Curr. Opin. Biotech. 10: 483-484). Sin embargo, en la actualidad la producción a gran escala de los EPSs de LAB es restringida debido a los bajos niveles producidos (40-800 mg l⁻¹ de cultivo) en comparación con *Xanthomonas campestris* que puede producir de 10 a 25 g l⁻¹ o convertir del 60 al 70% del azúcar sustrato en xantano por cultivo continuo.

Por otra parte, se han realizado estudios que indican que los EPS producidos por las LAB poseen efectos beneficiosos para la salud humana como estimuladores del sistema inmunitario y por ello se ha propuesto la utilización de las estirpes productoras para obtener alimentos funcionales (Jolly y cols. (2002) Antonie van Leeuwenhoek 82: 367-374). Además, algunos de los EPSs son β -glucanos y existen evidencias de que estos homopolisacáridos contribuyen a disminuir los niveles de colesterol sérico (Behall y cols. (1997) J. Am. College Nutr. 16:64-51. De ahí el interés de incorporar los β -glucanos a alimentos y preparados dietéticos y la necesidad de disponer de métodos eficientes para su producción a gran escala.

La caracterización estructural de los EPSs producidos por las estirpes aisladas de sidra *P. damnosus* 2.6 (Dueñas y cols. (1998) Carbohidr. Res. 303: 453-458), *Lactobacillus* sp. G77 (Dueñas y cols. (1997) Carbohidr. Res. 307: 125-133) y *Oenococcus oeni* 14 (resultados no publicados) revelaron que todas ellas sintetizan el mismo homopolisacárido del tipo β -D-glucano. Además, se ha demostrado, que tanto *P. damnosus* 2.6 como *Lactobacillus* sp. G77 pueden crecer y producir EPS durante la elaboración de alimentos fermentados basados en la avena, mejorando sus cualidades organolépticas (Olof Mårtensson y cols. (2002) Nutrition Research 22: 1461-1473).

En la actualidad, una elevada proporción de la población mundial adulta presenta intolerancia a la lactosa y se está creando una conciencia social sobre las reacciones alérgicas producidas por la leche y por la soja. La avena es un cereal que posee un alto valor nutritivo debido a su contenido en proteínas, vitamina E, ácidos grasos insaturados y minerales esenciales. Además, contiene un 4-6% de β -glucanos, que reducen los niveles de colesterol sérico en los seres humanos. Este efecto ha sido constatado en estudios clínicos sobre ingestión de alimentos basados en avena (ver detalles en <http://www.adavena.com>) y de hecho la FDA (Food and Drug Administration, USA) ha autorizado el etiquetado de "producto beneficioso para la salud" en preparados alimenticios basados en avena que contienen 0.75 g de fibra soluble (β glucano). La empresa Cereal Base (CEBA) (Lund, Suecia) está especializada en la producción de alimentos basados en cereales como alternativa a los productos lácteos. Ha desarrollado una tecnología denominada Adavena que ha permitido la obtención de una leche de avena con la que elabora productos como sucedáneos de yogures, postres lácteos, helados, etc. fermentados con LAB (Mårtensson *et al.*, 2002). Las propiedades nutritivas y dietéticas de estos preparados mejoran si se aumenta el contenido en β -glucanos de estos preparados, incorporando las bacterias productoras o bien por adición directa de esos polímeros.

Sin embargo, no se conocen los genes o vías metabólicas implicadas en esta producción de β -glucanos en microorganismos de potencial utilización en el sector alimentario.

Descripción**Descripción breve**

5 Un objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de DNA, en adelante secuencia de DNA *gtf* de la presente invención, proveniente de bacterias ácido lácticas GRAS (Generally Recognized as Safe) y codificante de una proteína con actividad glicosiltransferasa que permite la producción de exopolisacáridos (EPS) y que está constituida por una de las secuencias de nucleótidos seleccionada entre:

- 10 a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO9 o un fragmento de la misma; y
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

15 La invención también se refiere a un vector de expresión GTF que comprende la secuencia de DNA GTF de la invención, en adelante vector de expresión GTF de la invención, y que permite la transformación de microorganismos o células y la posterior obtención de microorganismos capaces de expresar la proteína GTF (SEQ ID NO6) y que permita al huésped adquirir la capacidad, o mejorar la ya existente, de producir EPS.

20 Otro objeto de la presente invención es el uso de la secuencia de DNA GTF o del vector de expresión GTF en un proceso de transformación celular para la obtención de células GTF.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una proteína con actividad glicosiltransferasa que está constituida por una de las secuencias de aminoácidos seleccionada entre:

- 25 a) la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO6 o un fragmento de la misma; y
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia definida en a).

30 Otro objeto de la invención lo constituye una célula, en adelante célula GTF de la presente invención, que comprende una secuencia de DNA GTF o un vector de expresión pGTF de la invención, capaz de expresar de forma recombinante la proteína GTF (SEQ ID NO6) y que, por lo tanto, adquiere la capacidad, o mejora la ya existente, de producir EPS.

35 Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de las células GTF para producir EPSs mediante un procedimiento que comprende:

- a) el crecimiento de la célula GTF en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión del vector de expresión GTF o de la secuencia de DNA GTF,
- 40 b) la producción de EPSs por la célula GTF de a), y
- c) la purificación de los EPS de b)

45 Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de las células GTF en procesos de fermentación de alimentos, entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, pertenecientes al siguiente grupo: productos lácteos, bebidas alcohólicas y avena.

Descripción detallada

50 La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas herramientas genéticas y biológicas que permitan la expresión de nuevas enzimas útiles para la producción de EPSs y la generación de microorganismos de valor industrial.

55 La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han identificado un gen *gtf* codificante de una enzima con actividad glicosiltransferasa (GTF), a partir de material genómico de *Pediococcus damnosus* 2.6. La expresión recombinante de este gen en *Streptococcus pneumoniae* y en *Lactococcus lactis* demostró la actividad glicosiltransferasa de la enzima codificada por dicho gen, así como la posibilidad de transformar con éxito bacterias Gram-positivas, incluyendo bacterias ácido lácticas, con dicho gen que adquieren la capacidad de su expresión. Las cepas de bacterias lácticas pueden ser útiles para la obtención de EPSs para su uso posterior como aditivo en el sector alimentario, y, además, su posterior manipulación genética para conferirles calidad GRAS puede permitir el uso de las mismas para la transformación de alimentos con nuevas propiedades. La sobreproducción de la GTF con actividad glicosiltransferasa podría permitir obtener dichos polímeros a gran escala para su incorporación como aditivos a alimentos y preparados dietéticos que poseen propiedades beneficiosas para la salud humana.

65 La comparación de la secuencia de dicho gen *gtf* con las depositadas en las bases de datos mostró la ausencia de homologías significativas. Sin embargo, al comparar la secuencia de la proteína GTF producto del gen *gtf* se observó que es homóloga a las glicosiltransferasas de la familia COG1215. Además, la proteína GTF presenta una homología relativamente elevada (34%) con la proteína Tts de *Streptococcus pneumoniae*, una glicosiltransferasa que

es el único enzima requerido para la biosíntesis y secreción de un β -D-glucano similar al de *P. damnosus* (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061). Esta característica se contrapone con los complejos operones (compuestos por unos 10 genes) que codifican las proteínas requeridas para la síntesis y secreción de los heteropolisacáridos y homopolisacáridos bacterianos utilizados actualmente a nivel industrial (Jolly y Stingle (2001) Int. Dairy J. 11: 733-745) y representa una clara e importante ventaja técnica. En consecuencia, una proteína con características similares a la Tts, pero proveniente de un microorganismo no patógeno y con calidad alimentaria tendría un potencial para la producción de β -D-glucanos por manipulación genética y de interés industrial.

El mismo equipo investigador ha observado, mediante la caracterización por PCR del gen *gtf* en distintas estirpes bacteriana productoras de β -D-glucano, de homo- o hetero-polisacáridos, que la proteína GTF está implicada específicamente en la biosíntesis de homopolisacáridos constituidos por β -D-glucano y no otro tipo de homo- o heteropolisacáridos (ver solicitud de patente española "Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos" (2004)).

Así, un objeto de la presente invención lo constituye una secuencia de DNA, en adelante secuencia de DNA GTF de la presente invención, proveniente de bacterias ácido lácticas GRAS y codificante de una proteína con actividad glicosiltransferasa que permite la producción de exopolisacáridos y que está constituida por una de las secuencias de nucleótidos seleccionada entre:

- a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO9 o un fragmento de la misma; y
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análoga" pretende incluir a cualquier secuencia de DNA que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID NO9, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En general, una secuencia de DNA análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID NO9. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

La molécula de DNA GTF de la invención procede de *P. damnosus* 2.6 y puede encontrarse en formas parecidas en otros microorganismos, entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: *Lactobacillus sp.* y *Oenococcus oeni*, donde pueden estar de forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica en el que el organismo transformado reproduzca dichas moléculas de DNA. La secuencia de DNA de la invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del DNA de cualquier microorganismo que la contenga, mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos, preparados gracias a la información de la secuencia de nucleótidos de dicha molécula de DNA, proporcionada en esta invención por un experto en la materia. Resultados obtenidos por el mismo equipo investigador indican que la producción de β -glucano por las estirpes *Pediococcus damnosus* 2.6, *Lactobacillus sp* G-77 y *Oenococcus oeni* O77 requiere la expresión del gen *gtf*, cuyas formas alélicas son prácticamente idénticas en todas las estirpes, aunque su localización genómica y los elementos reguladores de su expresión son diferentes en cada estirpe (ver solicitud de patente "Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos" (2004))

Por otro lado, a partir de la secuencia de DNA GTF de la presente invención un experto en la materia puede obtener otras delecciones o fragmentos proteicos derivados de esta proteína GTF o de sus formas homologas que mantengan su actividad glicosiltransferasa. Por tanto, la molécula de DNA de la invención incluye los fragmentos de la misma que presentan dicha actividad glicosiltransferasa.

En una realización particular, la secuencia de DNA GTF de la invención es una molécula de DNA de *P. damnosus* 2.6, y en concreto la SEQ ID NO9.

La secuencia de DNA GTF de la invención puede ser utilizada, en general, en la generación de un vector de expresión que permite la expresión de estas proteínas con actividad glicosiltransferasa en una amplia gama de células huésped.

Por tanto, la invención también se refiere a un vector de expresión GTF que comprende la secuencia de DNA GTF de la invención, en adelante vector de expresión GTF de la invención, y que permite la transformación de microorganismos o células y la posterior obtención de microorganismos capaces de expresar la proteína GFP (SEQ ID NO6) y que permita al huésped adquirir la capacidad, o mejorar la ya existente, de producir EPS.

En general, el vector de expresión de la presente invención comprende, al menos, una secuencia de DNA GTF de la invención y, al menos, un promotor que dirige la transcripción del gen de interés, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción del gen de interés y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen

de replicación, activadores transcripcionales, represores transcripcionales, secuencias de inserción, etc. Ejemplos a de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos y cósmidos con un origen de replicación bacteriano para que pueda ser amplificado en multicopia a partir de los elementos extra cromosómicos en bacterias o vectores integrativos para que pueda ser
 5 amplificado en monocopia a partir del cromosoma en bacterias, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transformadas diferente al gen de interés. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de DNA puede ser un plásmido que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma de la célula huésped.

10 El vector de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook y cols. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour laboratory Press N.Y.). Un objeto particular de la presente invención lo constituye el plásmido pGTF que contiene la secuencia de DNA GTF de la presente invención (ver Ejemplo 2).

15 Otro objeto de la presente invención es el uso de la secuencia de DNA GTF o del vector de expresión GTF en un proceso de transformación celular para la obtención de células GTF.

20 Otro objeto de la presente invención lo constituye una proteína con actividad glicosiltransferasa que está constituida por una de las secuencias de aminoácidos seleccionada entre:

- a) la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO6 o un fragmento de la misma; y
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia definida en a).

25 Otro objeto de la invención lo constituye una célula, en adelante célula GTF de la presente invención, que comprende una secuencia de DNA GTF o un vector de expresión pGTF de la invención, capaz de expresar de forma recombinante la proteína GTF (SEQ ID NO6) y que, por lo tanto, adquiere la capacidad, o mejora la ya existente, de producir EPS.

30 Las células hospedadoras que se pueden transformar con dicho vector de expresión pueden ser, tanto células bacterianas Gram-positivas como Gram-negativas, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención LABs pertenecientes a los géneros *Lactococcus* *Lactobacillus* y *Streptococcus* como *S. thermophilus*, distintas subespecies de *L. lactis* y *Lactobacillus delbrueckii, subsp. bulgaricus*, que son actualmente utilizados en la elaboración de
 35 productos lácteos.

Una realización particular de la presente invención lo constituye la célula GTF *L. lactis* MG1363[pGTF] y la célula *S. pneumoniae* R61[pGTF].

40 Las células GTF de la invención pueden ser utilizadas para la sobreproducción de EPSs para su posterior uso en las distintas posibles aplicaciones. Así, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de las células GTF para producir EPSs mediante un procedimiento que comprende:

- a) el crecimiento de la célula GTF en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión del
 45 vector de expresión GTF o de la secuencia de DNA GTF,
- b) la producción de EPSs por la célula GTF de a), y
- c) la purificación de los EPS de b)

50 La purificación de los EPS producidos por las células GTF puede ser realizada por técnicas convencionales conocidas por un experto en la materia.

55 Como se ha indicado anteriormente los EPSs así obtenidos pueden ser utilizados como agentes estabilizadores, espesantes, gelificadores y emulsionantes en múltiples procesos de manipulación, procesamiento y transformación de alimentos, por ejemplo, como aditivo en la fabricación de numerosos alimentos como derivados lácteos (yogures, batidos y helados, zumos y preparados a base de cereales), como sucedáneos de la nata y del vinagre (Sutherland (1998) Trends Biotechnol. 16: 41-46), como agentes estabilizadores de los alimentos (Sutherland (1998) Trends Biotechnol. 16: 41-46), en cosmética en forma de goma como espesante, estabilizador y agente de suspensión (Becker y cols. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 145-152), y como material en la síntesis de matrices utilizadas en técnicas de
 60 cromatografía, para el recubrimiento de superficies metálicas o para estabilizar jarabes.

Por otro lado, estos resultados permiten abrir nuevas posibilidades para transformar un sistema bacteriano GRAS, es decir, microorganismos - entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, estirpes de LAB pertenecientes a los géneros del siguiente grupo: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus* -
 65 que pueden ser utilizados en la industria alimentaria en procesos de fermentación de alimentos, entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, pertenecientes al siguiente grupo: productos lácteos, bebidas alcohólicas y avena, que permite la mejora de la textura de los productos fermentados, ej. yogourt y el queso

(de Vos (1999) Curr. Opin. Biotech. 10: 483-484) ola mejora de sus cualidades organolépticas (Olof Mårtensson y cols. (2002) Nutrition Research 22: 1461-1473).

Así, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de las células GTF en procesos de fermentación de alimentos, entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, pertenecientes al siguiente grupo: productos lácteos, bebidas alcohólicas y avena.

Descripción de las figuras

Figura 1.- *Mapa físico del plásmido pGTF*. Los símbolos genéticos utilizados son: *gtf*, codifica la glicosiltransferasa; *gfp*, codifica la proteína fluorescente verde; *erm*, codifica para la proteína responsable de la resistencia a eritromicina; *malR*, codifica para el represor transcripcional MalR; P_M , promotor de *gtf* y *gfp*; *copG* y *repB*, codifican las proteínas implicadas en la replicación del plásmido.

Figura 2.- *Predicción de la estructura secundaria de la proteína GTF de P. damnosus 2.6 utilizando el programa SOSUI*. Los colores de los aminoácidos corresponden a: negro, hidrofóbicos; azul, con cadena polar; azul y negrita, cargados positivamente; rojo, cargados negativamente.

Figura 3.- *Detección en S. pneumoniae y en L. lactis de la expresión de gtf y gfp respectivamente por detección microscópica de aglutinación y por microscopia de fluorescencia*. Contiene fotografías de cultivos celulares de las cepas de *S. pneumoniae*: R61[pLS1 RGFP] (A y B) y R61[pGTF] (C y D) y de *L. lactis*: MG1363[pLS1 RGFP] y MG1363[pGTF] detectados por microscopia de contraste de fase (A, C, E y G) y por microscopía de fluorescencia (B, D, F y H).

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Clonaje y caracterización del gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6

El clonaje de la región 5' del gen se realizó por amplificación de PCR utilizando el DNA total de los plásmidos portados por *P. damnosus* 2.6 y los oligonucleótidos degenerados 5'-TAYGAYAAYACNCARGARGT-3' (Oligo I, SEQ ID NO1) y 5'-ACRAARTARTCARTARTCTG-3' (Oligo II, SEQ ID NO2) (Y = T o C; W; R = A o G; N = A, C, G o T). Estos oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia de aminoácidos conservada de la glicosiltransferasa de *P. damnosus* I0EB8801 (Walling *et al.* (2001) Lait 81: 289-300), ya que la secuencia de nucleótidos del gen codificante no ha sido publicada, ni depositada en los bancos de datos de secuencias de DNA. El fragmento amplificado de 1,8 kb fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y el plásmido recombinante obtenido fue establecido en *Escherichia coli* DH5 α . La determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA reveló la existencia de un marco de lectura abierta carente de su región amino terminal. La secuencia de DNA obtenida fue utilizada para sintetizar los oligonucleótidos 5'-ACGCCCTGCGTGTTCATCATA-3' (SEQ ID NO3) y 5'-TGTGTAATGGCACTCACGAC-3' (SEQ ID NO4) y mediante reacción de PCR reversa se amplificó el extremo 5' del gen *gtf*, que fue clonado utilizando el mismo vector, método y bacteria huésped que se emplearon para clonar el extremo 3' del gen. La secuencia de 3352 nucleótidos de las regiones clonadas se muestra en la SEQ ID NO5 (nucleótidos 1-621 región 3' del gen *mobA*, nucleótidos 819-1085 gen hipotético ORF1 y nucleótidos 1282-2982 del gen *gtf*-región CDS). El gen *gtf* (SEQ ID NO 9) codifica la proteína GTF de 567 aminoácidos detallados en la SEQ ID NO6.

La comparación de la secuencia de DNA del gen *gtf* de *P. damnosus* con las depositadas en las bases de datos mostró la ausencia de homologías significativas. Sin embargo, al comparar la secuencia de la proteína (con la base de datos Swissprot) codificada por el gen *gtf* (GTF) se observó que es homóloga a glicosiltransferasas de la familia COG1215. Además, la proteína GTF presenta una homología relativamente elevada (34%) con la proteína Tts de *Streptococcus pneumoniae*, una glicosiltransferasa que es el único enzima requerido para la biosíntesis y secreción de un β -D-glucano similar al de *P. damnosus* (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24:21053-21061). Esta característica se contraponen con los complejos operones (compuestos por unos 10 genes) que codifican las proteínas requeridas para la síntesis y secreción de los heteropolisacáridos y homopolisacáridos bacterianos utilizados actualmente a nivel industrial (Jolly y Stingle (2001) Int. Dairy J. 11: 733-745). En consecuencia, una proteína con características similares a la Tts, pero proveniente de un microorganismo no patógeno y con calidad alimentaria tendría un potencial para la producción de β -D-glucanos por manipulación genética y de interés industrial.

Resultados obtenidos por el mismo equipo investigador indican que la producción de β -glucano por las estirpes *Pediococcus damnosus* 2.6, *Lactobacillus* sp G-77 y *Oenococcus oeni* O77 requiere la expresión del gen *gtf*, cuyas formas alélicas son prácticamente idénticas en todas las estirpes, aunque su localización genómica y los elementos reguladores de su expresión son diferentes en cada estirpe (ver solicitud de patente española "Procedimiento de detección molecular de bacterias ácido lácticas productoras de β -glucanos" (2004)).

Ejemplo 2

Construcción del vector pGTF que permite la sobreexpresión de la proteína GTF de Pediococcus damnosus 2.6

Como se ha comentado anteriormente, la homología de la GTF con la glicosiltransferasa Tts de *S. pneumoniae* (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061) y que constituye la cápsula del serotipo 37 (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061) indicaba que posiblemente la GTF es la única proteína responsable de la biosíntesis del exopolisacárido de *P. damnosus*. Por este motivo, se procedió a construir como parte de esta invención el plásmido recombinante pGTF sobreproductor de GTF y que contiene la secuencia de DNA del gen *gtf* de la invención (SEQ ID NO9) (Figura 1). En el vector de expresión pLS1RGFP (Nieto y cols. (2000) Plasmid 43: 205-213) se clonó entre el promotor inducible P_M y el gen reportero *gfp* un fragmento de DNA que incluye la región codificante del gen *gtf*. Para ello se amplificó la región que incluye el gen *gtf* utilizando la DNA polimerasa Pfu (Stratagene) y utilizando como sustrato el DNA total de los plásmidos portados por *P. damnosus* 2.6 y los oligonucleótidos 5'-TCTAGAAATTAAAGGAATGTGTAA-3' (SEQ ID NO7) y 5'-TCTAGATTAATCATTCCAATCAACTG-3' (SEQ ID NO8), que incluyen la secuencia de reconocimiento del enzima de restricción *Xba*I. El fragmento amplificado de 1,734 kb fue clonado, en la orientación correcta respecto al promotor P_M en el sitio único *Xba*I de pLS1RGFP y, posteriormente, el plásmido recombinante fue establecido en la estirpe no capsulada R61 de *S. pneumoniae* (estirpe R6 cuyo genoma ha sido secuenciado Hoskins y cols. (2001) J. Bacteriol. 183: 5709-5717 y que fue denominada R61 por el Dr. Sanford Lacks en: Lacks (1968) Genetics 60: 685-706) por transformación y selección de los transformantes por resistencia a 5 µg ml⁻¹ de eritromicina (marcador de resistencia del plásmido vector) según se describe en Lacks (1968) Genetics 60: 685-706) obteniéndose la estirpe *S. pneumoniae* R61[pGTF]. El plasmido pGTF, que es capaz de replicar en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y contiene una fusión transcripcional P_M-*gtf-gfp*, que permite una sobreexpresión por crecimiento de las células portadoras en medio conteniendo maltosa y una detección de la expresión desde el promotor P_M por medida de la fluorescencia de la proteína GFP (Nieto y cols. (2000) Plasmid 43: 205-213).

Ejemplo 3

Detección in vitro de la función de GTF integrada en membranas de S. pneumoniae

La glicosiltransferasa Tts de *S. pneumoniae* es una proteína integral de membrana (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061). El análisis de la predicción de la localización topológica de la GTF de *P. damnosus* 2.6 utilizando el programa SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>) reveló que el dominio catalítico de la proteína (aminoácidos 83 a 377 está localizado en el citoplasma bacteriano) y que existen seis regiones transmembranales: dos localizadas en el extremo amino terminal de la proteína precediendo al dominio catalítico de ésta y cuatro localizadas en su región carboxilo (Figura 2). Por los motivos antedichos se procedió a purificar membranas de las estirpes de *S. pneumoniae* R61 portadoras del plásmido pGTF o del plásmido vector pLS1RGFP y determinar la actividad glicosiltransferasa utilizando como sustrato UDP-glucosa. Para ello, células de las estirpes de *S. pneumoniae* R61[pLS1RGFP] (Nieto y cols. (2000) Plasmid 43: 205-213) y R61[pGTF] fueron crecidas en 1 l de medio Todd-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5%, sacarosa al 0,1% y maltosa al 0,8% hasta una A650 de 0,4. Los cultivos de las dos estirpes mostraron un tiempo de duplicación similar (Tabla 1), indicando que la expresión de la fusión P_M-*gtf-gfp* no tenía un efecto deletéreo para *S. pneumoniae*. La valoración de la expresión a partir del promotor P_M se realizó mediante la determinación de la fluorescencia debida a la proteína GFP de 0,1 ml de los cultivos por espectrometría de fluorescencia (Nieto y cols. (2000) Plasmid 43: 205-213). Los resultados obtenidos (Tabla 1) mostraron, que en las dos estirpes analizadas existía expresión de la proteína GFP siendo ligeramente inferior en la R61[pGTF] que en la estirpe portadora del vector, efecto observado en construcciones previas al intercalar un gen entre el promotor P_M y el gen *gfp* (resultados no mostrados).

Para realizar la obtención de membrana requeridas para determinar la actividad glicosiltransferasa, las células presentes en 1 l de medio fueron sedimentadas por centrifugación a 12000 x g durante 20 minutos (min) a 4°C y resuspendidas en el tampón A (70 mM Tris.HCl pH 7,0, 9 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) con 0.2 M fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y sedimentadas por centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4°C. Las bacterias resuspendidas en el tampón A fueron sometidas a rotura mecánica pasándolas dos veces por una prensa de French (Aminco). El homogeneizado fue centrifugado a 12000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue otra vez centrifugado a 12000 x g durante 30 min a 4°C. Las membranas sedimentadas fueron resuspendidas en 2 ml de tampón A conteniendo 0.2 mM de PMSF y almacenadas a -80°C. La concentración de proteínas de las preparaciones de membranas se determinó utilizando el sistema BCA Protein Assay (Pierce). La determinación de la actividad glicosiltransferasa fue realizada utilizando 30 µM (0.1 µCi) UDP-[¹⁴C]glucosa (actividad específica 333 mCi/mmol) en un tampón A suplementado con 50 mM NaCl en un volumen total de 100 µl y membranas en un rango de concentraciones comprendido entre 0,05 y 0,5 mg ml⁻¹ de proteínas. Las reacciones se realizaron por incubación a 30°C durante 15 min. La reacción fue terminada por adición de SDS a una concentración final del 0,5% e incubación a 37°C durante 15 min. Seguidamente se adicionó seroalbumina bovina a una concentración final del 0,4% y 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Después de una incubación durante 30 min a 0°C, las mezclas se filtraron a través de filtros Whatman GF/A y fueron lavadas con 15 ml de TCA al 10%. Los filtros se secaron a 65°C durante 20 min y la radioactividad presente en ellos se midió en un contador de centelleo (LKB Wallack). Los resultados obtenidos (Tabla 1) revelaron la existencia de actividad glicosiltransferasa en las membranas de las dos estirpes analizadas. Los niveles fueron aproximadamente 2,5 veces superiores en la estirpe R61[pGTF] en comparación con la estirpe control. Este incremento era presumiblemente debido a la actividad glicosiltransferasa de la GTF de *P. damnosus*. En el caso de la estirpe control R61[pLS1RGFP]

los niveles de actividad detectados podrían ser debidos a los productos de los genes *cpoA* y *epsG* cromosomales de *S. pneumoniae*, cuya función es desconocida, pero que por homología están propuestos como glicosiltransferasas en el banco de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

TABLA 1

*Efecto de la inducción de la fusión P_M -gtf-gfp en el crecimiento, niveles de GFP y de actividad glicosiltransferasa en *S. pneumoniae**

Estirpe	¹ Tiempo de duplicación (min)	² Fluorescencia de la GFP (unidades arbitrarias)	³ Actividad glicosil transferasa (unidades)
R61[pLS1 RGFP]	30	152,85	243,71±42
R61[pGTF]	35	98,7	615,46±193

¹ El tiempo de duplicación de las bacterias se calculó utilizando las medidas de A_{650} durante el crecimiento.

² La fluorescencia de 0,1 ml de los cultivos previamente sedimentados y resuspendidos en 0,1 ml de tampón PBS pH 7,2 se midió en placas de microtítulo en un espectrofotómetro LS_50B (Perkin Elmer) mediante una excitación a una longitud de onda de 488 nm con una apertura de 5 y la detección de la fluorescencia se realizó a una longitud de onda de 511 nm con una apertura de 5.

³ Los valores representan la media y la desviación estandar de 10 determinaciones empleando distintas concentraciones de membranas en el rango de 0.05 a 0.5 mg ml⁻¹ de proteína. Una unidad de actividad glicosil transferasa corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la incorporación en un producto macromolecular de 1 pmol de glucosa por mg de proteína y por minuto.

Ejemplo 4

*Detección de la función de GTF In vivo en *S. pneumoniae* y *L. lactis**

Los resultados de detección de actividad glicosiltransferasa indicaban que el plásmido pGTF codifica la proteína GTF en forma activa. Ya que los anticuerpos desarrollados frente a la cápsula del serotipo 37 de *S. pneumoniae* son muy específicos y no reaccionan con estirpes no capsuladas o de otros serotipos de *S. pneumoniae* o con otras bacterias, se procedió a utilizar dichos anticuerpos para valorar *in vivo* la expresión funcional de la GTF de *Pediococcus* tanto en *S. pneumoniae* R61[pGTF] como en la estirpe MG1363 de *Lactococcus lactis* (a la cual se había transferido el plásmido pGTF por transformación). La expresión funcional de la GTF fue determinada mediante la técnica de aglutinación utilizando anticuerpos desarrollados frente a la cápsula de *S. pneumoniae* serotipo 37 y por microscopia (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061). Células de las cepas de *S. pneumoniae* R61[pLS1 RGFP] y R61[pGTF] fueron crecidas en medio Tood-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5%, sacarosa al 0,1% y maltosa al 0,8% a una A_{650} de 0,4. Células de las cepas de *L. lactis* MG1363[pLS1RGFP] y MG1363[pGTF] fueron crecidas en medio Tood-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5% y maltosa al 5% a una A_{660} de 0,5. Un ml de cada uno de los cultivos fue sedimentado por centrifugación y las células fueron resuspendidas en 100 μ l de tampón PBS pH 8,0 (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl). Diez μ l de cada uno de los cultivos fueron mezclados con 10 μ l del anticuerpo desarrollado frente al serotipo 37 neumocócico (Statens Seruminstitut, Dinamarca) y mantenidos a 4°C durante 2 horas. Las preparaciones fueron analizadas por microscopia de contraste de fase y fluorescencia utilizando un microscopio Zeiss Axioplan (Universal microscope) con filtros de fluorescencia de excitación Standard FITC set D480/30 y emisión TBP 4601530/610. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Figura 3. La fluorescencia de la proteína GFP permitió detectar por microscopia de fluorescencia la existencia de expresión génica a partir del promotor P_M de pLS1 RGFP y de pGTF en las células de *S. pneumoniae* (Figuras 3B y 3D) y *L. lactis* (Figuras 3F y 3H) inducidas con maltosa. Las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia y contraste de fase revelaron que sólo las células de *S. pneumoniae* (Figuras 3C y 3D) y de *L. lactis* (Figuras 3G y 3H) portadoras del plásmido pGTF e inducidas con maltosa eran capaces de aglutinar. Estos resultados muestran que pGTF confiere a *S. pneumoniae* y a *L. lactis* la capacidad de sintetizar el exopolisacárido.

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de DNA GTF **caracterizada** porque proviene de bacterias ácido lácticas GRAS, codifica una proteína con actividad glicosiltransferasa que permite la producción de exopolisacaridos (EPS) y porque está constituida por una de las secuencias de nucleótidos seleccionada entre:

a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO9 o un fragmento de la misma; y

b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).

2. Secuencia de DNA GTF según la reivindicación 1 **caracterizada** porque es la SEQ ID NO9.

3. Vector de expresión GTF **caracterizado** porque comprende la secuencia de DNA GTF según las reivindicaciones 1 y 2.

4. Vector de expresión GTF según la reivindicación 3 **caracterizado** porque es el plásmido pGTF

5. Uso de la secuencia de DNA GTF según las reivindicaciones 1 y 2 o del vector de expresión GTF según las reivindicaciones 3 y 4 en un proceso de transformación celular.

6. Proteína con actividad glicosiltransferasa **caracterizada** porque está constituida por una de las secuencias de aminoácidos seleccionada entre:

a) la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO6 o un fragmento de la misma; y

b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia definida en a).

7. Célula GTF **caracterizada** porque comprende una secuencia de DNA GTF según las reivindicaciones 1 y 2 o un vector de expresión pGTF según una de las reivindicaciones 3 y 4, capaz de expresar de forma recombinante la proteína GTF según la reivindicación 6 y, por lo tanto, adquiere la capacidad, o mejora la ya existente, de producir EPSs.

8. Uso de las células GTF según la reivindicación 7 en un procedimiento para producir EPSs.

9. Uso de las células GTF según la reivindicación 8 **caracterizado** porque el procedimiento comprende:

a) el crecimiento de la célula GTF en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión del vector de expresión GTF o de la secuencia de DNA GTF,

b) la producción de EPSs por la célula GTF, y

c) la purificación de los EPSs de b).

10. Uso de las células GTF según la reivindicación 7 en procesos de fermentación de alimentos.

11. Uso de las células GTF según la reivindicación 10 **caracterizado** porque los procesos de fermentación de alimentos pertenecen al siguiente grupo: productos lácteos, bebidas alcohólicas y avena.

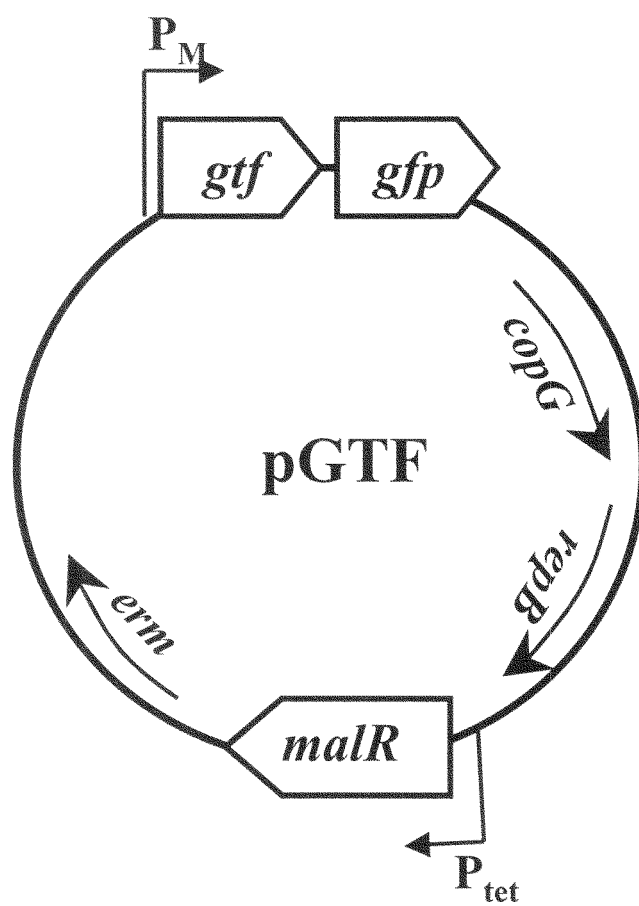


Figura 1

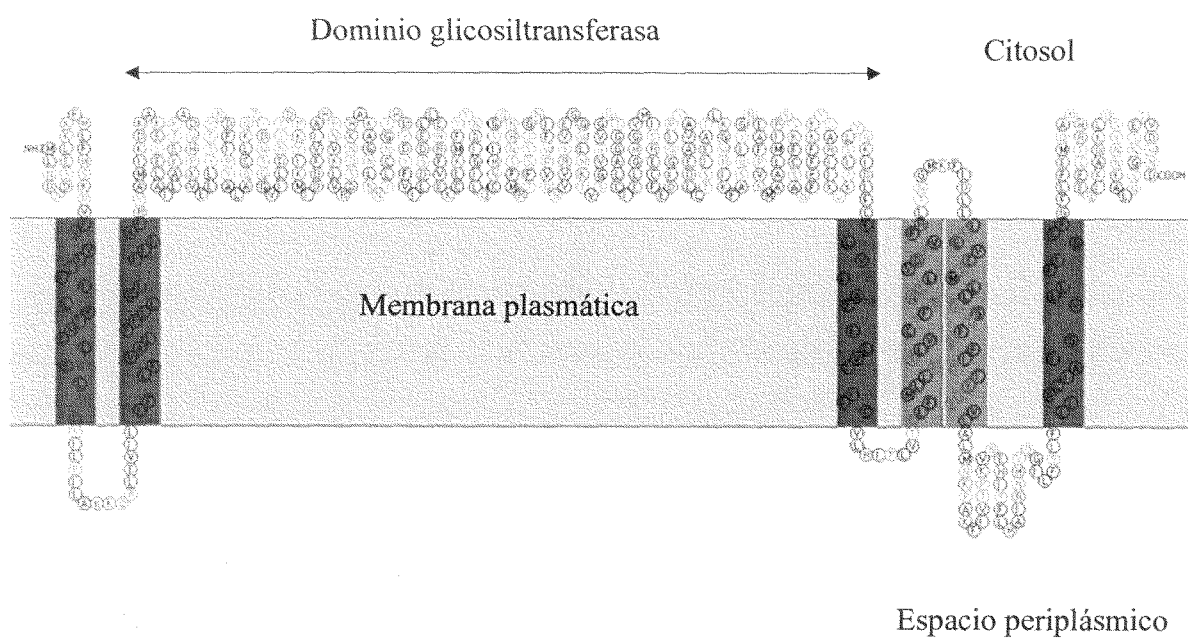


Figura 2

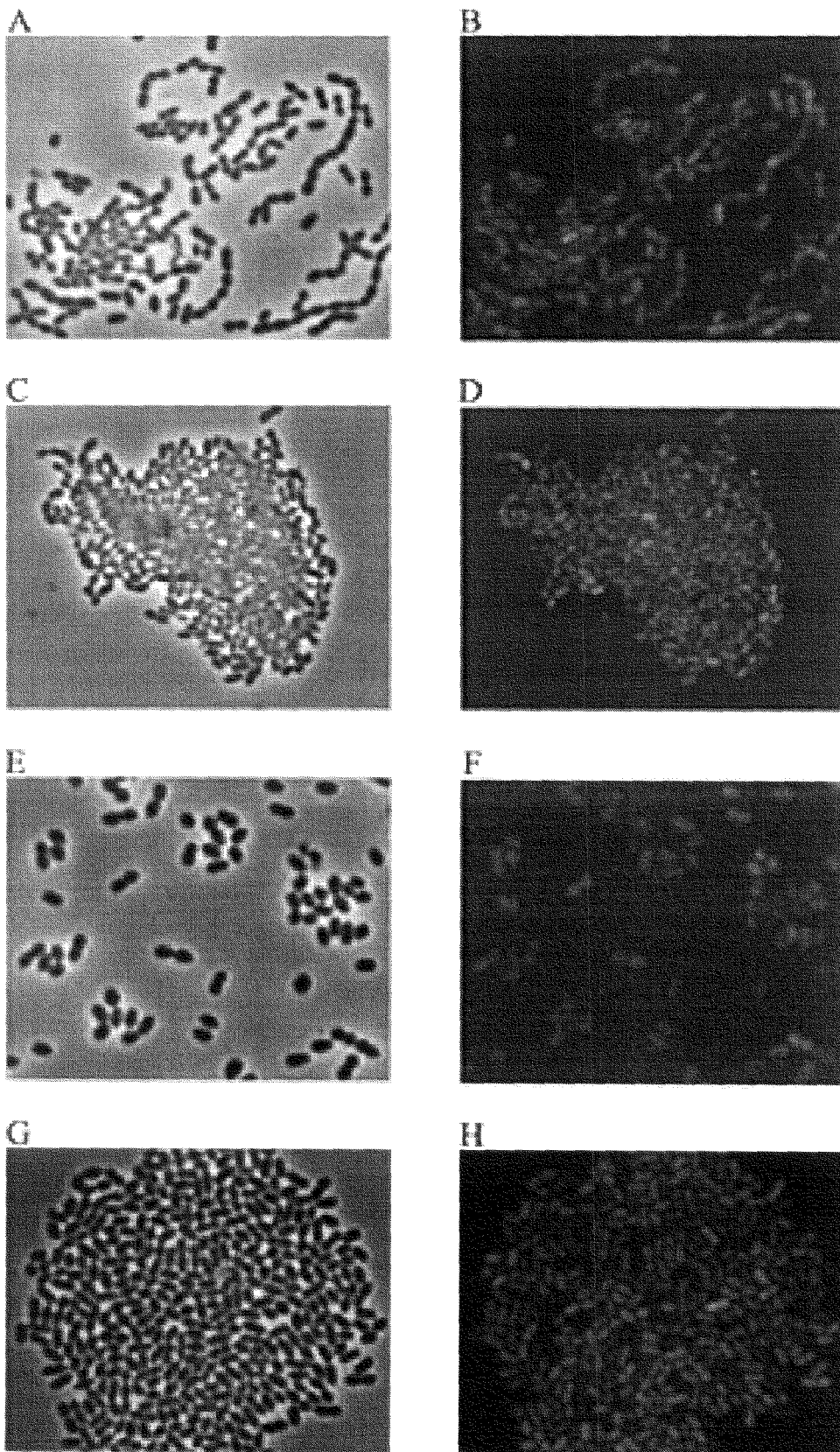


Figura 3

ES 2 251 301 B1

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO UNIVERSIDAD DE CANTABRIA	
	<120> SECUENCIAS, VECTORES Y CÉLULAS GTF Y SUS APLICACIONES EN EL SECTOR ALIMENTARIO	
10	<130> Gen gtf	
	<160> 9	
15	<170> PatentIn version 3.2	
	<210> 1	
	<211> 20	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
	<220>	
25	<223> Oligo degA	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (12)..(12)	
	<223> n is a, c, g, or t	
35	<400> 1	
	taygayaaya cncargargt	20
40	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial sequence	
45	<220>	
	<223> Oligo degB	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (12)..(12)	
	<223> n is a, c, g, or t	
55	<400> 2	
	taygayaaya cncargargt	20
60	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial sequence	

ES 2 251 301 B1

<220>

<223> Oligo III

5 <400> 3

acgccctgcg tggtatcata

20

10 <210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15

<220>

<223> Oligo IV

20 <400> 4

tgtgtaatgg cactcagac

20

25 <210> 5

<211> 3352

<212> DNA

<213> *Pediococcus damnosus*

30

<220>

<221> CDS

<222> (1282)..(2982)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 251 301 B1

<400> 5

5	tgacaacacg caggaagttt taagaagagc ctttcctaac ggtaatttta atgaattacc	60
	aatgattaaa caggaacaag cctatacagc cgtgatgtac tatgatcctg ttttaaagcc	120
	atgtcaggct gaaacaattg aacagtggca agcaaatcca ccacaggtgt tcgggtcccc	180
10	agaacatcaa caaggactag cttatttatc ggggcagctt agcttagatc agttagaaaa	240
	tcattcactta caacgggttt taaagcatga tggcactaaa caactctttt ttggcgaatg	300
15	caaagccgat ccgacgatta agaacagtca gatcgagaaa atccaaaagc agttaaaaagg	360
	gcaacaagcc aaggacgacc agtatagaaa agtaaatatt ggacattatc aaccgctaaa	420
20	ttacaagcca gttagtccaa gctaccactt aaagacggcc tttagtaacg caatcatgac	480
	cgccttatat gcccgatgatg aagattacga acggcaaaaa caggcgcaag gtttaaagga	540
25	gactgagtgg gaaatgacga aaaagcaacg gcaacaccaa actcgaaacc ggcatgaaga	600
	tgggggcatg cacttgtaat ctaaagttaa aattaaaagt gcaccaacgt gtcatttaa	660
30	tgggtacaatg aaccataat atagggaaaag gagtattcac atgtgacaaa gaaacaggaa	720
	tggtttagct tagctcaagc tagtctcaag cttgaacgag gtagtacgta cgtgagtgtt	780
	tggttaagac ggcaccctaa cgagttgcca agtgaaatgc tcattggaaac gggcaaagtt	840
35	aaattaatat ctgaagatgg cattgaatgg attaaaaacc acataaaaaa agagggcgtc	900
	ctcgtaagca gtgaagttgc taacggggat cagcacctgg aagttacgat tctaggtgtc	960
40	accctcctaa caatccattt taccggcggt gttaggggaa agctagtgga tcctaattgt	1020
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 251 301 B1

	tcaaaaaaca gcgaaaagac aaacgacgcg atactgccgc aaaactcagc cattgttttc	1080
	taaggattaa gtcttttgga ttttgtgtat ctatcaactc cttaaagcct tctgagtcct	1140
5	ataataaccc aaaagtgatc tataaaatgc tctacgtcga tttaccgttg accgatagtt	1200
	gaatagctca cggttagcta aaatatcggt aaatgaaaaa tggaatatatt tatggaaaaa	1260
10	aattaaagga atgtagtata a atg tta aat gat aat gat tca gaa cta aaa	1311
	Met Leu Asn Asp Asn Asp Ser Glu Leu Lys	
	1 5 10	
15	aaa ttt cac ttg ttt cat tct aaa cca gtc ttt gta cca gtt att tta	1359
	Lys Phe His Leu Phe His Ser Lys Pro Val Phe Val Pro Val Ile Leu	
	15 20 25	
20	att att tgg ttg ttt att atg tgc tta tat gaa tat tta aca tac aca	1407
	Ile Ile Trp Leu Phe Ile Met Cys Leu Tyr Glu Tyr Leu Thr Tyr Thr	
	30 35 40	
25	gat agc ata ctt cct att tta gct aaa aag caa cca cta gaa gta att	1455
	Asp Ser Ile Leu Pro Ile Leu Ala Lys Lys Gln Pro Leu Glu Val Ile	
	45 50 55	
30	tta cct ata ttc aat caa tta ttt gtg gca ctt ttc ttt ttg ctt gga	1503
	Leu Pro Ile Phe Asn Gln Leu Phe Val Ala Leu Phe Phe Leu Leu Gly	
	60 65 70	
35	ata act aat att att atc gct atc cgc tat gca atg att aaa gac aaa	1551
	Ile Thr Asn Ile Ile Ile Ala Ile Arg Tyr Ala Met Ile Lys Asp Lys	
	75 80 85 90	
40	gca aaa gaa tcc gaa cta gca ata ctc gca aaa gaa acg cct gca gac	1599
	Ala Lys Glu Ser Glu Leu Ala Ile Leu Ala Lys Glu Thr Pro Ala Asp	
	95 100 105	
45	tgg cac cct aaa gtt gag tta ttg tat acg acc tat aat gat ttt ata	1647
	Trp His Pro Lys Val Glu Leu Leu Tyr Thr Thr Tyr Asn Asp Phe Ile	
	110 115 120	
50	cct tat gca cta gct caa tgt tta aaa cag aca tat gat aac acg cag	1695
	Pro Tyr Ala Leu Ala Gln Cys Leu Lys Gln Thr Tyr Asp Asn Thr Gln	
	125 130 135	
55	ggc gtt att ttg gat aac tct aca gac ccc aaa tac atc aag atg att	1743
	Gly Val Ile Leu Asp Asn Ser Thr Asp Pro Lys Tyr Ile Lys Met Ile	
	140 145 150	
60	gat gat ttt gtg ata gcc cat cct aat gta aag tta gtc aga gat tct	1791
	Asp Asp Phe Val Ile Ala His Pro Asn Val Lys Leu Val Arg Asp Ser	
	155 160 165 170	
65	caa aac aag cat gct aaa gct gga aac tta aac aat tat ttg tgt aat	1839
	Gln Asn Lys His Ala Lys Ala Gly Asn Leu Asn Asn Tyr Leu Cys Asn	
	175 180 185	
65	ggc act cat gac tac gat tac ttt gtt atc cta gat agc gat gaa tta	1887
	Gly Thr His Asp Tyr Asp Tyr Phe Val Ile Leu Asp Ser Asp Glu Leu	
	190 195 200	

ES 2 251 301 B1

	tta gaa aat aga ttt gta gaa aaa tgt tta aag atg ttt tat tac aat	1935
	Leu Glu Asn Arg Phe Val Glu Lys Cys Leu Lys Met Phe Tyr Tyr Asn	
	205 210 215	
5		
	gat att ggc att ctt cag tgt aat cac att agt gga caa aac cac aat	1983
	Asp Ile Gly Ile Leu Gln Cys Asn His Ile Ser Gly Gln Asn His Asn	
	220 225 230	
10		
	tcg ttt atg cgt act ttc tct agt tct ggc aat att ttt tgg cca gtg	2031
	Ser Phe Met Arg Thr Phe Ser Ser Ser Gly Asn Ile Phe Trp Pro Val	
	235 240 245 250	
15		
	caa aac gtt gta cga agc gtt gaa ggt ggc tgg tta aat aaa act gtg	2079
	Gln Asn Val Val Arg Ser Val Glu Gly Gly Trp Leu Asn Lys Thr Val	
	255 260 265	
20		
	tct ggc gtt tct gta ggc caa act gga ggt gca tta tgt att gaa tta	2127
	Ser Gly Val Ser Val Gly Gln Thr Gly Gly Ala Leu Cys Ile Glu Leu	
	270 275 280	
25		
	ggc cat ggc gtc atg att tca cgt gaa tgc ttt gaa gat att gga caa	2175
	Gly His Gly Val Met Ile Ser Arg Glu Cys Phe Glu Asp Ile Gly Gln	
	285 290 295	
30		
	ata ccc tat gcg gtg gca gaa gac ctt tgt act tct att gaa gct aca	2223
	Ile Pro Tyr Ala Val Ala Glu Asp Leu Cys Thr Ser Ile Glu Ala Thr	
	300 305 310	
35		
	cta aaa ggc tgg aac att aaa ttt gct tca caa att tac ggt aat gaa	2271
	Leu Lys Gly Trp Asn Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ile Tyr Gly Asn Glu	
	315 320 325 330	
40		
	gcg ttt cct gtt aat atg gca gca tta atg att aga tct agt aag ttt	2319
	Ala Phe Pro Val Asn Met Ala Ala Leu Met Ile Arg Ser Ser Lys Phe	
	335 340 345	
45		
	tgt tct gca aat ttt gaa ttt ttt aaa aaa tat tcg gcg aga atc atc	2367
	Cys Ser Ala Asn Phe Glu Phe Phe Lys Lys Tyr Ser Ala Arg Ile Ile	
	350 355 360	
50		
	aag tca aag acc ata agt ctc tat caa aaa atc gac ttg ttt tgt ttt	2415
	Lys Ser Lys Thr Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Leu Phe Cys Phe	
	365 370 375	
55		
	acc cta tca gtt cca ata agt gct ttt caa tat att agc tta gtt att	2463
	Thr Leu Ser Val Pro Ile Ser Ala Phe Gln Tyr Ile Ser Leu Val Ile	
	380 385 390	
60		
	act agt ata att tgt cca gtg ttg cac att cca cta gta aca caa tta	2511
	Thr Ser Ile Ile Cys Pro Val Leu His Ile Pro Leu Val Thr Gln Leu	
	395 400 405 410	
65		
	ttt atg tta tta cca acg tta gtc tgt tac ttt agt caa agt ttg gtc	2559
	Phe Met Leu Leu Pro Thr Leu Val Cys Tyr Phe Ser Gln Ser Leu Val	
	415 420 425	
65		
	gat act gtc ttt cat ttg aca aac ggt atg aaa ttc tta gat tta ttg	2607
	Asp Thr Val Phe His Leu Thr Asn Gly Met Lys Phe Leu Asp Leu Leu	
	430 435 440	

ES 2 251 301 B1

att tat gaa gta gaa tca atg ttg tta tat ggg tct ttt tat ttt att 2655
 Ile Tyr Glu Val Glu Ser Met Leu Leu Tyr Gly Ser Phe Tyr Phe Ile
 445 450 455

5

aca atc aag tct acc gta cta gct tta atg aac aaa cct gct aaa ttc 2703
 Thr Ile Lys Ser Thr Val Leu Ala Leu Met Asn Lys Pro Ala Lys Phe
 460 465 470

10

ata gtt aca ccg aag gtt aat gag cat ata act ttt ctg cat gca ata 2751
 Ile Val Thr Pro Lys Val Asn Glu His Ile Thr Phe Leu His Ala Ile
 475 480 485 490

15

aga aat cat tat caa gga atc tta ttt tca ata ttt aca ata att gca 2799
 Arg Asn His Tyr Gln Gly Ile Leu Phe Ser Ile Phe Thr Ile Ile Ala
 495 500 505

20

tgt atc gca att tct gga agt tat tgg gta tta tta tca ttt att ccg 2847
 Cys Ile Ala Ile Ser Gly Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ser Phe Ile Pro
 510 515 520

25

ggt tgt ttt ggg ttt ttg ttc gaa atg caa gct aat cat cgg aca tca 2895
 Gly Cys Phe Gly Phe Leu Phe Glu Met Gln Ala Asn His Arg Thr Ser
 525 530 535

30

gaa gaa caa ata aaa gcg gat aaa tta cag agt tac aac aat aag gca 2943
 Glu Glu Gln Ile Lys Ala Asp Lys Leu Gln Ser Tyr Asn Asn Lys Ala
 540 545 550

35

tta caa tct ggc aac acg gaa aca gtt gat tgg aat gat taaaattaca 2992
 Leu Gln Ser Gly Asn Thr Glu Thr Val Asp Trp Asn Asp
 555 560 565

40

tcattactat ttttttagtat aggagtaaaa aaggtgagaa gtcagaaatt ttaatctggg 3052

taaagtagtg aattgtttta tcgaatgata aactgctgaa tctattttat aacgaaggac 3112

acagcgcttt aatccgtatg caaaaagatg gctgaaaagg aaactcggct taaacagcat 3172

45

aaatgtcagt actgttttta cggatcacccg ggagtcagcg gttcgacttt taccagcatc 3232

cgctgttaca actgcagact ggcaccctaa agttgagtta ttgtatacga cctataatga 3292

50

ttttatacct tatgcactag ctcaatgttt aaaacagaca tatgataaca cgcagggcgt 3352

<210> 6
 <211> 567
 55 <212> PRT
 <213> *Pediococcus damnosus*
 <400> 6

60

Met Leu Asn Asp Asn Asp Ser Glu Leu Lys Lys Phe His Leu Phe His
 1 5 10 15

65

Ser Lys Pro Val Phe Val Pro Val Ile Leu Ile Ile Trp Leu Phe Ile
 20 25 30

ES 2 251 301 B1

	Met	Cys	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile
			35					40					45			
5	Leu	Ala	Lys	Lys	Gln	Pro	Leu	Glu	Val	Ile	Leu	Pro	Ile	Phe	Asn	Gln
		50					55					60				
10	Leu	Phe	Val	Ala	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu	Gly	Ile	Thr	Asn	Ile	Ile	Ile
	65					70					75				80	
15	Ala	Ile	Arg	Tyr	Ala	Met	Ile	Lys	Asp	Lys	Ala	Lys	Glu	Ser	Glu	Leu
					85					90					95	
20	Ala	Ile	Leu	Ala	Lys	Glu	Thr	Pro	Ala	Asp	Trp	His	Pro	Lys	Val	Glu
				100					105						110	
25	Leu	Leu	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Asn	Asp	Phe	Ile	Pro	Tyr	Ala	Leu	Ala	Gln
			115					120					125			
30	Cys	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Asp	Asn	Thr	Gln	Gly	Val	Ile	Leu	Asp	Asn
		130						135					140			
35	Ser	Thr	Asp	Pro	Lys	Tyr	Ile	Lys	Met	Ile	Asp	Asp	Phe	Val	Ile	Ala
	145						150				155					160
40	His	Pro	Asn	Val	Lys	Leu	Val	Arg	Asp	Ser	Gln	Asn	Lys	His	Ala	Lys
					165					170					175	
45	Ala	Gly	Asn	Leu	Asn	Asn	Tyr	Leu	Cys	Asn	Gly	Thr	His	Asp	Tyr	Asp
				180					185					190		
50	Tyr	Phe	Val	Ile	Leu	Asp	Ser	Asp	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Arg	Phe	Val
			195					200					205			
55	Glu	Lys	Cys	Leu	Lys	Met	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Asp	Ile	Gly	Ile	Leu	Gln
		210					215					220				
60	Cys	Asn	His	Ile	Ser	Gly	Gln	Asn	His	Asn	Ser	Phe	Met	Arg	Thr	Phe
	225					230					235					240
65	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Ile	Phe	Trp	Pro	Val	Gln	Asn	Val	Val	Arg	Ser
				245						250					255	
70	Val	Glu	Gly	Gly	Trp	Leu	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Val	Gly
			260						265					270		

ES 2 251 301 B1

	Gln	Thr	Gly	Gly	Ala	Leu	Cys	Ile	Glu	Leu	Gly	His	Gly	Val	Met	Ile	
			275					280					285				
5	Ser	Arg	Glu	Cys	Phe	Glu	Asp	Ile	Gly	Gln	Ile	Pro	Tyr	Ala	Val	Ala	
		290					295					300					
10	Glu	Asp	Leu	Cys	Thr	Ser	Ile	Glu	Ala	Thr	Leu	Lys	Gly	Trp	Asn	Ile	
	305					310					315					320	
15	Lys	Phe	Ala	Ser	Gln	Ile	Tyr	Gly	Asn	Glu	Ala	Phe	Pro	Val	Asn	Met	
					325					330					335		
20	Ala	Ala	Leu	Met	Ile	Arg	Ser	Ser	Lys	Phe	Cys	Ser	Ala	Asn	Phe	Glu	
				340					345					350			
25	Phe	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ala	Arg	Ile	Ile	Lys	Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	
			355					360					365				
30	Leu	Tyr	Gln	Lys	Ile	Asp	Leu	Phe	Cys	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Pro	Ile	
	370						375					380					
35	Ser	Ala	Phe	Gln	Tyr	Ile	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Ser	Ile	Ile	Cys	Pro	
	385					390					395				400		
40	Val	Leu	His	Ile	Pro	Leu	Val	Thr	Gln	Leu	Phe	Met	Leu	Leu	Pro	Thr	
					405					410					415		
45	Leu	Val	Cys	Tyr	Phe	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Asp	Thr	Val	Phe	His	Leu	
				420					425					430			
50	Thr	Asn	Gly	Met	Lys	Phe	Leu	Asp	Leu	Leu	Ile	Tyr	Glu	Val	Glu	Ser	
		435						440					445				
55	Met	Leu	Leu	Tyr	Gly	Ser	Phe	Tyr	Phe	Ile	Thr	Ile	Lys	Ser	Thr	Val	
	450						455					460					
60	Leu	Ala	Leu	Met	Asn	Lys	Pro	Ala	Lys	Phe	Ile	Val	Thr	Pro	Lys	Val	
	465				470						475				480		
65	Asn	Glu	His	Ile	Thr	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Arg	Asn	His	Tyr	Gln	Gly	
				485					490					495			
70	Ile	Leu	Phe	Ser	Ile	Phe	Thr	Ile	Ile	Ala	Cys	Ile	Ala	Ile	Ser	Gly	
			500						505					510			

ES 2 251 301 B1

Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ser Phe Ile Pro Gly Cys Phe Gly Phe Leu
 515 520 525
 5
 Phe Glu Met Gln Ala Asn His Arg Thr Ser Glu Glu Gln Ile Lys Ala
 530 535 540
 10
 Asp Lys Leu Gln Ser Tyr Asn Asn Lys Ala Leu Gln Ser Gly Asn Thr
 545 550 555 560
 15
 Glu Thr Val Asp Trp Asn Asp
 565

20 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

25 <220>
 <223> Oligo V

30 <400> 7

tctagaaatt aaaggaatgt gtaa

24

35 <210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

40 <220>
 <223> Oligo VI

45 <400> 8

tctagattaa tcattccaat caactg

26

50 <210> 9

<211> 1701
 <212> DNA

55 <213> *Pediococcus damnosus*

60

65

ES 2 251 301 B1

<400> 9

	atgttaa	atg	ataatgat	agaactaaaa	aaatttcact	tgtttcattc	taaaccagtc	60
5	tttgtaccag	ttattttta	at	tatttggtt	gttattatgt	gcttatatga	atattttaaca	120
	tacacagata	gcatacttcc	tatttttagct	aaaaagcaac	cactagaagt	aattttacct		180
10	atattcaatc	aattattt	gt	ggcacttttc	tttttgcttg	gaataactaa	tattattatc	240
	gctatccgct	atgcaatgat	taaagacaaa	gcaaaagaat	ccgaactagc	aatactcgca		300
15	aaagaaacgc	ctgcagactg	gcaccctaaa	gttgagttat	tgtatacgac	ctataatgat		360
	tttatacctt	atgcactagc	tcaatgttta	aaacagacat	atgataacac	gcagggcggt		420
	attttggata	actctacaga	ccccaaatac	atcaagatga	ttgatgattt	tgtgatagcc		480
20	catccta	aatg	ttag	cagagattct	caaaacaagc	atgctaaagc	tggaaactta	540
	aacaattatt	tgtgta	atgg	cactcatgac	tacgattact	ttgttatcct	agatagcgat	600
25	gaattattag	aaaatagatt	tgtagaaaa	tgtttaaaga	tgttttatta	caatgatatt		660
	ggcattcttc	agtgta	atca	cattagtgga	caaaaccaca	attcgtttat	gcgtactttc	720
30	tctagttctg	gcaatatttt	ttggccagtg	caaaacgttg	tacgaagcgt	tgaaggtggc		780
	tggttaaata	aaactgtgtc	tggcgtttct	gtaggccaaa	ctggaggtgc	attatgtatt		840
35	gaattaggtc	atggcgat	catgatttcacgt	gaatgctttg	aagatattgg	acaaataccc		900
	tatgcggtgg	cagaagacct	ttgtacttct	attgaagcta	cactaaaagg	ctggaacatt		960
40	aaatttgctt	cacaaattta	cggtaatgaa	gcgtttcctg	ttaatatggc	agcattaatg		1020
	attagatcta	gtaagttttg	ttctgcaaat	tttgaatttt	ttaaaaaata	ttcggcgaga		1080
45	atcatcaagt	caaagaccat	aagtctctat	caaaaaatcg	acttgttttg	ttttacccta		1140
	tcagttccaa	taagtgtttt	tcaatatatt	agcttagtta	ttactagtat	aatttgtcca		1200
	gtgttgca	atccactagt	aacacaatta	tttatgttat	taccaacggt	agtctgttac		1260
50	tttagtcaaa	gtttggtcga	tactgtcttt	catttgacaa	acggtatgaa	attcttagat		1320
	ttattgattt	atgaagtaga	atcaatgttg	ttatatgggt	ctttttattt	tattacaatc		1380
55	aagtctaccg	tactagcttt	aatgaacaaa	cctgctaaat	tcatagttac	accgaagggt		1440
	aatgagcata	taacttttct	gcatgcaata	agaaatcatt	atcaaggaat	cttattttca		1500
60	atatttacia	taattgcatg	tatcgcaatt	tctggaagtt	attgggtatt	attatcattt		1560
	attccgggtt	gttttgggtt	tttgttcgaa	atgcaagcta	atcatcggac	atcagaagaa		1620
65	caaataaaag	cggataaatt	acagagttac	aacaataagg	cattacaatc	tggcaacacg		1680
	gaaacagttg	attggaatga	t					1701



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 251 301

⑫ Nº de solicitud: 200402175

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 11.09.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12N 9/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WALLING, E.; GINDREAU, E.; LONVAUD-FUNEL, A. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de <i>Pediococcus damnosus</i> isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. Lait. Enero-abril 2001, Vol. 81, Nº 1-2, páginas 289-300. ISSN 0023-7302.	1-9
A		10,11
A	MARTENSSON, O.; STAAF, M.; DUEÑAS-CHASCO, M. et al. A fermented, ropy, non-dairy oat product based on the exopolysaccharide-producing strain <i>Pediococcus damnosus</i> . Advances in Food Sciences. 2002, Vol. 24, Nº 1, páginas 4-11. ISSN 1431-7737.	8-11
A	MARTENSSON, O.; HASKA, L.; DUEÑAS-CHASCO, M. et al. Development of an oat-based sour milk-like product. Advances in Food Sciences. 2003, Vol. 25, Nº 3, páginas 100-106. ISSN 1431-7737.	8-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.02.2006

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/1