(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
30 de Marzo de 2006 (30.03.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/032718 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 9/10 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070127

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de Septiembre de 2005 (08.09.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200402175
11 de Septiembre de 2004 (11.09.2004) ES

(71) Solicitantes *(para todos los Estados designados salvo US)*: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/ SERRANO, 117, E-28006 MADRID (ES). **UNIVERSIDAD DE CANTABRIA** [ES/ES]; PABELLON DE GOBIERNO, AVENIDA LOS CASTROS, s/n, E-39005 SANTANDER (ES). **UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO** [ES/ES]; CAMPUS DE LEIOA, E-48940 LEIOA (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **LÓPEZ GARCÍA, Paloma** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones científicas, C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 MADRID (ES). **WERNING, María, Laura** [AR/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones científicas, C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 MADRID (ES). **IRASTORZA IRIBAS, Ana** [ES/ES]; Universidad del Pais Vasco, CAMPUS DE LEIOA, E-48940 LEIOA (ES). **DUEÑAS CHASCO, María Teresa** [ES/ES]; Universidad del Pais vasco, CAMPUS DE LEIOA, E-48940 LEIOA (ES). **IBARBURU LÓPEZ, Idoia** [ES/ES]; Universidad del Pais Vasco, CAMPUS DE LEIOA, E-48940 LEIOA (ES). **NAVAS MÉNDEZ, Jesús** [ES/ES]; Universidad de Cantabria, Pabellon de Gobierno, s/n, E-39005 SANTANDER (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional*
— *con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) **Title:** GTF CELLS, VECTORS AND SEQUENCES AND APPLICATIONS THEREOF IN THE FOOD SECTOR

(54) **Título:** SECUENCIAS, VECTORES Y CÉLULAS GTF Y SUS APLICACIONES EN EL SECTOR ALIMENTARIO

(57) **Abstract:** The invention relates to GTF micro-organisms, vectors and sequences which are formed by or comprise gene *gtf de P.damnosus 2.6* which encodes a glycosyltransferase that is located in the membrane and which enables the production of exopolysaccharides of the ß-glucan type by overexpression of said recombinant gene. The fact that only one gene is involved in the synthesis of the aforementioned enzyme facilitates the optimisation of the expression conditions which enable the production of ß-glucans on an industrial scale. Said polymers, which can be used as additives in numerous foods, also have properties that are beneficial to human health. Moreover, said transformed GTF micro-organisms can be used in processes for the fermentation of foods, such as dairy products, alcoholic drinks and oats.

(57) **Resumen:** 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.

WO 2006/032718 A1

TÍTULO

SECUENCIAS, VECTORES Y CÉLULAS GTF Y SUS APLICACIONES EN EL SECTOR ALIMENTARIO

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.

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, pare 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 nivel 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 azucar 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* I4 (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 htpp//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 (Martensson 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

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 exopolisacaridos (EPS) 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).

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.

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:

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).

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.

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,

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

c) la purificación de los EPS de b)

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

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.

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 *Pedioccocus damnosus* 2.6. La expresión recombinante de este gen en *Streptococcus pneumoniae* y en *Lactococcus lactis* demostró la actividad glicosiltrasferasa 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 conferirlas 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.

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 glicosiltranferasas de la familia COG1215. Además, la proteína GTF presenta una homología relativamente elevada (34%) con la proteína Tts de *Streptococus 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 Stingele (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 homopolisacaráridos constituidos por β-D-glucano y no otro tipo de homo- o hetero-polisacáridos (ver solicitud de patente española "PROCEDIMENTO 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 exopolisacaridos 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 deleción 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 "PROCEDIMENTO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE β-GLUCANOS" (2004))

Por otro lado, a partir de la secuencia de DNA GFT de la presente invención un experto en la materia puede obtener otras deleciones 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

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 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.

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 Sprig 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).

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:

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).

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.

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 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].

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 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)

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

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 cromatografía, pare 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 titulo 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* - 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) o la 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 microscopía de fluorescencia. Contiene fotografías de cultivos celulares de las cepas de *S. pneumoniae*: R61[pLS1RGFP] (A y B) y R61[pGTF] (C y D) y de *L. lactis* : MG1363[pLS1RGFP] y MG1363[pGTF] detectados por microscopía 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´-ACRAARTARTCRTARTCRTG-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 glicosil transferasa de *P. damnosus* IOEB8801 (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* DH5α. 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´-ACGCCCTGCGTGTTATCATA-3´ (SEQ ID NO3) y 5´-TGTGTAATGGCACTCACGAC-3´ (SEQ ID NO4) y mediante reacción de PCR reversa se amplificó el extremo 5´ del gen *gft*, 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 *gft* (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 glicosiltranferasas de la familia COG1215. Además, la proteína GTF presenta una homología relativamente elevada (34%) con la proteína Tts de *Streptococus 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 Stingele (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 "PROCEDIMENTO 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 *gft* 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 *gtl* 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 $\mu g\ ml^{-1}$ 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- gram positivas y negativas 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/sosuiframe0.html) reveló que el dominio catalítico de la

proteína (aminoácidos 83 a 377 está localizado en el citoplama 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. peumoniae* R61[pLS1RGFP] (Nieto y cols. (2000) Plasmid 43: 205-213) y R61[pGTF] fueron crecidas en 1 l de medio Tood-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5%, sacarosa al 0,1% y maltosa al 0,8% hasta una A_{650} 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 litro de medio fueron sedimentadas por centrifugación a 12000 x g durante 20 minutos (min) a 4ºC y resuspendidas en el tampón A (70 mM Tris.HCl pH 7,0, 9 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$) con 0.2 M fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y sedimentadas por centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4ºC. 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 4ºC y el sobrenadante fue otra vez centrifugado a 12000 x g durante 30 min a 4ºC. Las membranas sedimentadas fueron resuspendidas en 2 ml de tampón A conteniendo 0.2 mM de PMSF y almacenadas a –80ºC. 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-[^{14}C]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 30ºC durante 15 min. Las reacción fue terminada por adición de SDS a una concentración final del 0,5% e incubación a 37ºC 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 0ºC, las mezclas se filtraron a través de filtros Wathman GF/A y fueron lavadas con 15 ml de TCA al 10%. Los filtros se secaron a 65ºC 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[pLS1RGFP]	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 medidad 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 macromolar 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 microscopía (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061). Células de las cepas de *S. peumoniae* R61[pLS1RGFP] 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 µl de tampón PBS pH 8,0 (10 mM Na_2HPO_4, 1 mM KH_2PO_4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl). Diez µl de cada uno de los cultivos fueron mezclados con 10 µl del anticuerpo desarrollado frente al serotipo 37 neumocócico (Statens Seruminstitut, Dinamarca) y mantenidos a 4ºC durante 2 horas. Las preparaciones fueron analizadas por microscopía de contraste de fase y fluorescencia utilizando un microscopio Zeiss Axioplan (Universal microcope) con filtros de fluorescencia de excitación Standard FITC set D480/30 y emisión TBP 460/530/610. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Figura 3. La fluorescencia de la proteína GFP permitió detectar por microscopía de fluorescencia la existencia de expresión génica a partir del promotor P_M de pLS1RGFP 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 qué 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.

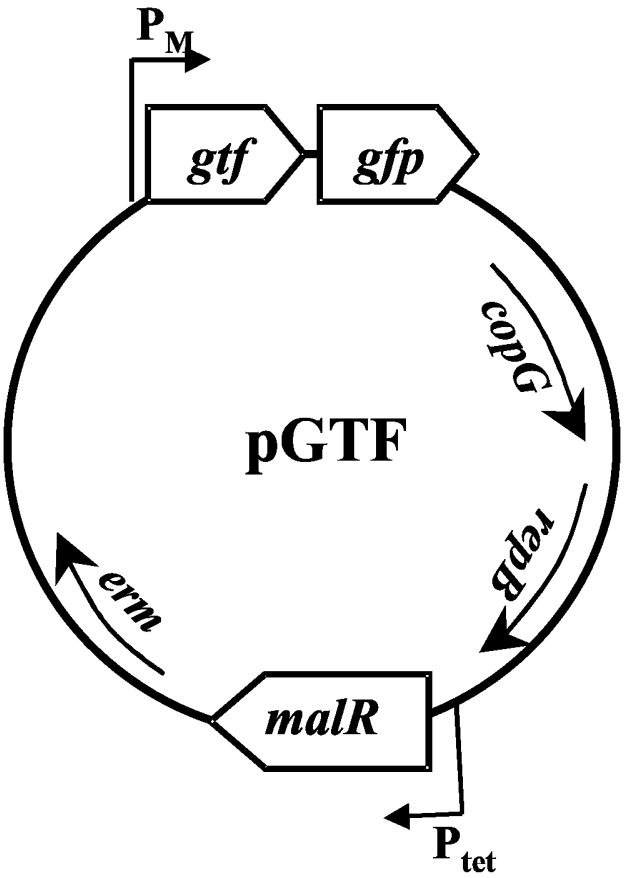

Figura 1

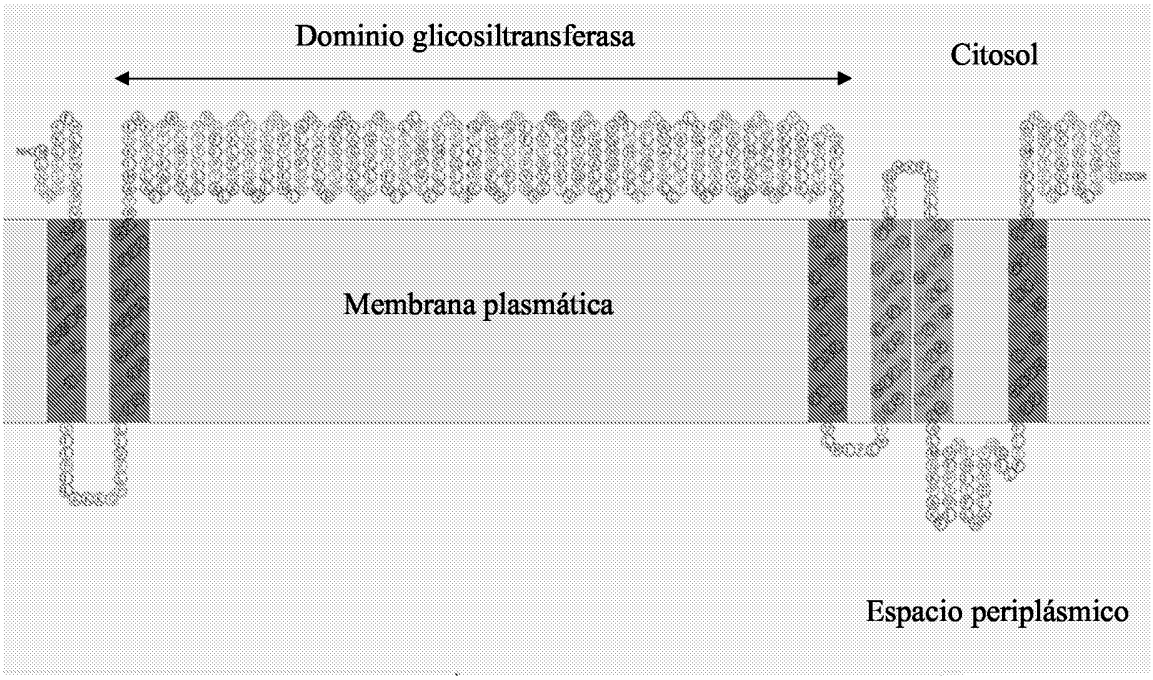
Dominio glicosiltransferasa
Citosol
Membrana plasmática
Espacio periplásmico

Figura 2

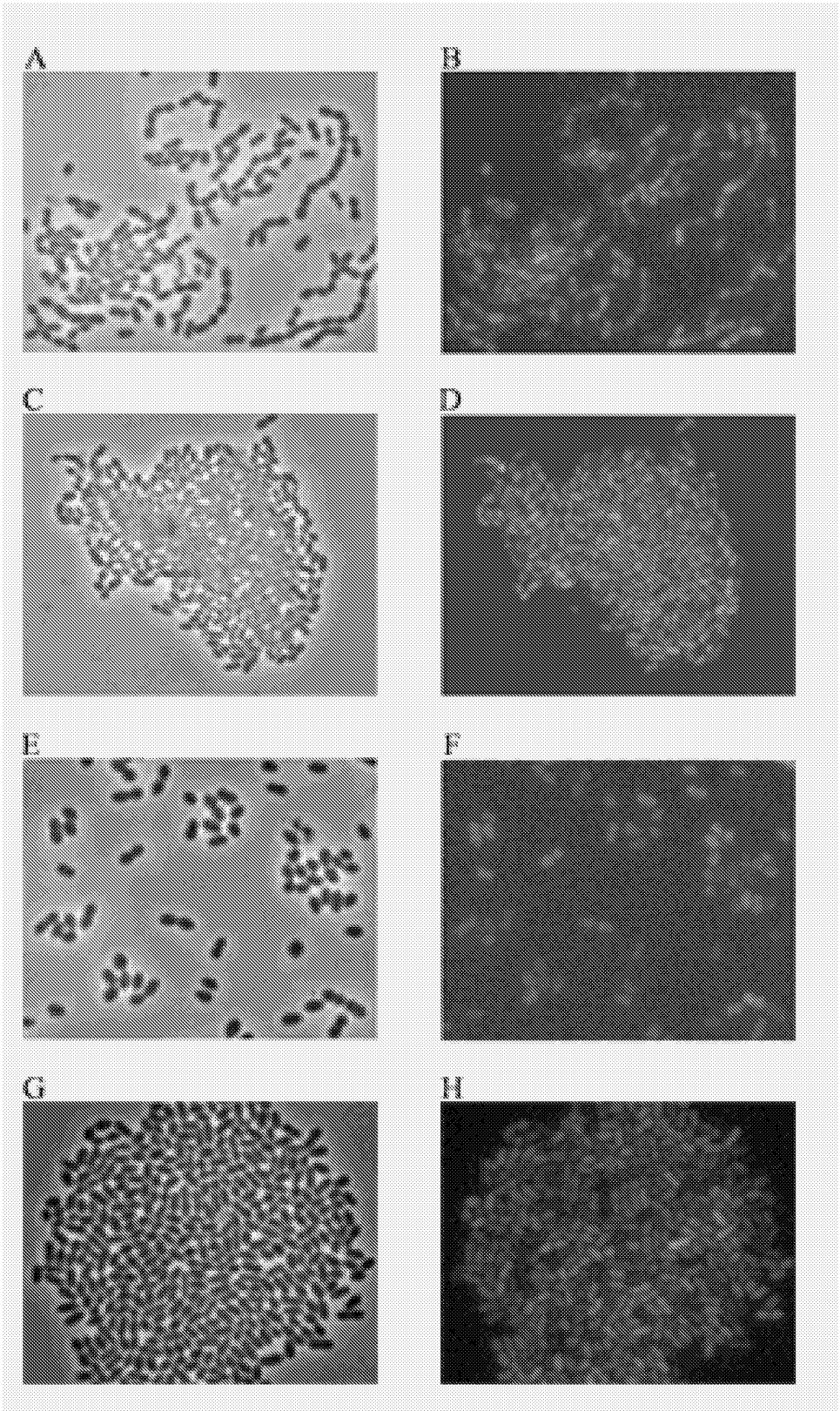

Figura 3

SEQUENCE LISTING

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> SECUENCIAS, VECTORES Y CÉLULAS GTF Y SUS APLICACIONES EN EL SECTOR ALIMENTARIO

<130> Gen gtf

<160> 9

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo degA

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 1
taygayaaya cncargargt 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo degB

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 2
taygayaaya cncargargt 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo III

<400> 3
acgccctgcg tgttatcata 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligo IV

<400> 4
tgtgtaatgg cactcacgac 20

<210> 5
<211> 3352
<212> DNA
<213> Pediococcus damnosus

<220>
<221> CDS
<222> (1282)..(2982)

<400> 5
tgacaacacg caggaagttt taagaagagc ctttcctaac ggtaatttta atgaattacc 60

aatgattaaa caggaacaag cctatacagc cgtgatgtac tatgatcctg ttttaaagcc 120

atgtcaggct gaaacaattg aacagtggca agcaaatcca ccacaggtgt tcggtccccc 180

agaacatcaa caaggactag cttatttatc ggggcagctt agcttagatc agttagaaaa 240

tcatcactta caacgggttt taaagcatga tggcactaaa caactctttt ttggcgaatg 300

caaagccgat ccgacgatta agaacagtca gatcgagaaa atccaaaagc agttaaaagg 360

gcaacaagcc aaggacgacc agtatagaaa agtaaatatt ggacattatc aaccgctaaa 420

ttacaagcca gttagtccaa gctaccactt aaagacggcc tttagtaacg caatcatgac 480

cgccctatat gcccgtgatg aagattacga acggcaaaaa caggcgcaag gtttaaagga 540

gactgagtgg gaaatgacga aaaagcaacg gcaacaccaa actcgaaacc ggcatgaaga 600

tgggggcatg cacttgtaat ctaaatgtaa aattaaaagt gcaccaacgt gctcatttaa 660

tggtacaatg aacccataat atagggaaag gagtattcac atgtgacaaa gaaacaggaa 720

tggtttagct tagctcaagc tagtctcaag cttgaacgag gtagtacgta cgtgagtgtt 780

tggttaagac ggcaccctaa cgagttgcca agtgaaatgc tcatggaaac gggcaaagtt 840

aaattaatat ctgaagatgg cattgaatgg attaaaaacc acataaaaaa agagggcgtc 900

ctcgtaagca gtgaagttgc taacggggat cagcacctgg aagttacgat tctaggtgtc 960

accctcctaa caatccattt tacccggcgg gttaggggaa agctagtgga tcctaattgt 1020

tcaaaaaaca gcgaaaagac aaacgacgcg atactgccgc aaaactcagc cattgttttc 1080

```
taaggattaa gtcttttgga ttttgtgtat ctatcaactc cttaaagcct tctgagtcct   1140

ataataaccc aaaagtgatc tataaaatgc tctacgtcga tttaccgttg accgatagtt   1200

gaatagctca cggttagcta aaatatcgtt aaatgaaaaa tggaatattt tatggaaaaa   1260

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ggt 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

tcattactat tttttagtat aggagtaaaa aaggtgagaa gtcagaaatt ttaatctggg   3052

taaagtagtg aattgtttta tcgaatgata aactgctgaa tctattttat aacgaaggac   3112

acagcgcttt aatccgtatg caaaaagatg gctgaaaagg aaactcggct taaacagcat   3172

aaatgtcagt actgttttta cggatcaccg ggagtcagcg gttcgacttt taccagcatc   3232

cgctgttaca actgcagact ggcaccctaa agttgagtta ttgtatacga cctataatga   3292

ttttatacct tatgcactag ctcaatgttt aaaacagaca tatgataaca cgcagggcgt   3352
```

<210> 6
<211> 567
<212> PRT
<213> Pediococcus damnosus

<400> 6

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

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

Met Cys Leu Tyr Glu Tyr Leu Thr Tyr Thr Asp Ser Ile Leu Pro Ile
        35                  40                  45
```

```
Leu Ala Lys Lys Gln Pro Leu Glu Val Ile Leu Pro Ile Phe Asn Gln
    50                  55                  60

Leu Phe Val Ala Leu Phe Phe Leu Leu Gly Ile Thr Asn Ile Ile Ile
65                  70                  75                  80

Ala Ile Arg Tyr Ala Met Ile Lys Asp Lys Ala Lys Glu Ser Glu Leu
                85                  90                  95

Ala Ile Leu Ala Lys Glu Thr Pro Ala Asp Trp His Pro Lys Val Glu
            100                 105                 110

Leu Leu Tyr Thr Thr Tyr Asn Asp Phe Ile Pro Tyr Ala Leu Ala Gln
        115                 120                 125

Cys Leu Lys Gln Thr Tyr Asp Asn Thr Gln Gly Val Ile Leu Asp Asn
    130                 135                 140

Ser Thr Asp Pro Lys Tyr Ile Lys Met Ile Asp Asp Phe Val Ile Ala
145                 150                 155                 160

His Pro Asn Val Lys Leu Val Arg Asp Ser Gln Asn Lys His Ala Lys
                165                 170                 175

Ala Gly Asn Leu Asn Asn Tyr Leu Cys Asn Gly Thr His Asp Tyr Asp
            180                 185                 190

Tyr Phe Val Ile Leu Asp Ser Asp Glu Leu Leu Glu Asn Arg Phe Val
        195                 200                 205

Glu Lys Cys Leu Lys Met Phe Tyr Tyr Asn Asp Ile Gly Ile Leu Gln
    210                 215                 220

Cys Asn His Ile Ser Gly Gln Asn His Asn Ser Phe Met Arg Thr Phe
225                 230                 235                 240

Ser Ser Ser Gly Asn Ile Phe Trp Pro Val Gln Asn Val Val Arg Ser
                245                 250                 255

Val Glu Gly Gly Trp Leu Asn Lys Thr Val Ser Gly Val Ser Val Gly
            260                 265                 270

Gln Thr Gly Gly Ala Leu Cys Ile Glu Leu Gly His Gly Val Met Ile
        275                 280                 285
```

Ser Arg Glu Cys Phe Glu Asp Ile Gly Gln Ile Pro Tyr Ala Val Ala
290 295 300

Glu Asp Leu Cys Thr Ser Ile Glu Ala Thr Leu Lys Gly Trp Asn Ile
305 310 315 320

Lys Phe Ala Ser Gln Ile Tyr Gly Asn Glu Ala Phe Pro Val Asn Met
325 330 335

Ala Ala Leu Met Ile Arg Ser Ser Lys Phe Cys Ser Ala Asn Phe Glu
340 345 350

Phe Phe Lys Lys Tyr Ser Ala Arg Ile Ile Lys Ser Lys Thr Ile Ser
355 360 365

Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Leu Phe Cys Phe Thr Leu Ser Val Pro Ile
370 375 380

Ser Ala Phe Gln Tyr Ile Ser Leu Val Ile Thr Ser Ile Ile Cys Pro
385 390 395 400

Val Leu His Ile Pro Leu Val Thr Gln Leu Phe Met Leu Leu Pro Thr
405 410 415

Leu Val Cys Tyr Phe Ser Gln Ser Leu Val Asp Thr Val Phe His Leu
420 425 430

Thr Asn Gly Met Lys Phe Leu Asp Leu Leu Ile Tyr Glu Val Glu Ser
435 440 445

Met Leu Leu Tyr Gly Ser Phe Tyr Phe Ile Thr Ile Lys Ser Thr Val
450 455 460

Leu Ala Leu Met Asn Lys Pro Ala Lys Phe Ile Val Thr Pro Lys Val
465 470 475 480

Asn Glu His Ile Thr Phe Leu His Ala Ile Arg Asn His Tyr Gln Gly
485 490 495

Ile Leu Phe Ser Ile Phe Thr Ile Ile Ala Cys Ile Ala Ile Ser Gly
500 505 510

Ser Tyr Trp Val Leu Leu Ser Phe Ile Pro Gly Cys Phe Gly Phe Leu
515 520 525

Phe Glu Met Gln Ala Asn His Arg Thr Ser Glu Glu Gln Ile Lys Ala
530 535 540

Asp Lys Leu Gln Ser Tyr Asn Asn Lys Ala Leu Gln Ser Gly Asn Thr
545 550 555 560

Glu Thr Val Asp Trp Asn Asp
565

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

<220>
<223> Oligo V

<400> 7
tctagaaatt aaaggaatgt gtaa 24

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

<220>
<223> Oligo VI

<400> 8
tctagattaa tcattccaat caactg 26

<210> 9
<211> 1701
<212> DNA
<213> Pediococcus damnosus

<400> 9
atgttaaatg ataatgattc agaactaaaa aaatttcact tgtttcattc taaaccagtc 60

tttgtaccag ttatttttaat tatttggttg tttattatgt gcttatatga atatttaaca 120

tacacagata gcatacttcc tattttagct aaaaagcaac cactagaagt aattttacct 180

atattcaatc aattatttgt ggcacttttc tttttgcttg gaataactaa tattattatc 240

gctatccgct atgcaatgat taaagacaaa gcaaaagaat ccgaactagc aatactcgca 300

aaagaaacgc ctgcagactg gcaccctaaa gttgagttat tgtatacgac ctataatgat 360

tttatacctt atgcactagc tcaatgttta aaacagacat atgataacac gcagggcgtt 420

attttggata actctacaga ccccaaatac atcaagatga ttgatgattt tgtgatagcc 480

catcctaatg taaagttagt cagagattct caaaacaagc atgctaaagc tggaaactta 540

aacaattatt tgtgtaatgg cactcatgac tacgattact ttgttatcct agatagcgat 600

gaattattag aaaatagatt tgtagaaaaa tgtttaaaga tgttttatta caatgatatt 660

ggcattcttc agtgtaatca cattagtgga caaaaccaca attcgtttat gcgtactttc 720

tctagttctg gcaatatttt ttggccagtg caaaacgttg tacgaagcgt tgaaggtggc 780

tggttaaata aaactgtgtc tggcgtttct gtaggccaaa ctggaggtgc attatgtatt 840

gaattaggtc atggcgtcat gatttcacgt gaatgctttg aagatattgg acaaataccc 900

tatgcggtgg cagaagacct ttgtacttct attgaagcta cactaaaagg ctggaacatt 960

aaatttgctt cacaaattta cggtaatgaa gcgtttcctg ttaatatggc agcattaatg 1020

attagatcta gtaagttttg ttctgcaaat tttgaatttt ttaaaaaata ttcggcgaga 1080

atcatcaagt caaagaccat aagtctctat caaaaaatcg acttgttttg ttttacccta 1140

tcagttccaa taagtgcttt tcaatatatt agcttagtta ttactagtat aatttgtcca 1200

gtgttgcaca ttccactagt aacacaatta tttatgttat taccaacgtt agtctgttac 1260

tttagtcaaa gtttggtcga tactgtcttt catttgacaa acggtatgaa attcttagat 1320

ttattgattt atgaagtaga atcaatgttg ttatatgggt ctttttattt tattacaatc 1380

aagtctaccg tactagcttt aatgaacaaa cctgctaaat tcatagttac accgaaggtt 1440

aatgagcata taacttttct gcatgcaata agaaatcatt atcaaggaat cttattttca 1500

atatttacaa taattgcatg tatcgcaatt tctggaagtt attgggtatt attatcattt 1560

attccgggtt gttttgggtt tttgttcgaa atgcaagcta atcatcggac atcagaagaa 1620

caaataaaag cggataaatt acagagttac aacaataagg cattacaatc tggcaacacg 1680

gaaacagttg attggaatga t 1701

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2005/070127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10 (2006.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. Lait. Enero-abril 2001, Vol. 81, N° 1-2, **pages** 289-300. ISSN 0023-7302.	1-9 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 *Pediococcus damnosus*. Advances in Food Sciences. 2002, Vol. 24, N°1, **pages** 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, N°3, **pages** 100-106. ISSN 1431-7737.	8-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 December 2005 (16/12/2005)	**22 December 2005 (22/12/2005)**
Name and mailing address of the ISA/ **S.P.T.O.** C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Facsimile No. N° de fax 34 91 3495304	Authorized officer E. Relaño Reyes Telephone No. 34 91 3493047

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/070127

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/10 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus*	1-9
A	*damnosus* 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.	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 *Pediococcus damnosus*. Advances in Food Sciences. 2002, Vol. 24, Nº1, 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, Nº3, páginas 100-106. ISSN 1431-7737.	8-11

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
16 Diciembre 2005 (16.12.2005)	22 DICIEMBRE 2005 (22.12.2005)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado E. Relaño Reyes Nº de teléfono + 34 91 3493047