



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 238 119**

② Número de solicitud: 200202566

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **08.11.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2005**

Fecha de la concesión: **01.02.2007**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

⑰ Titular/es: **Universidad de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-CITT-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Sieiro Vázquez, Carmen y
González Villa, Tomás**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento de obtención de la enzima endopoligalacturonasa mediante el cultivo de cepas microbianas recombinantes que sobreexpresan el gen EPG2 de *Kluyveromyces marxianus*.**

㉒ Resumen:

Procedimiento de obtención de la enzima endopoligalacturonasa mediante el cultivo de cepas microbianas recombinantes que sobreexpresan el gen EPG2 de *Kluyveromyces marxianus*. Se describe la clonación y secuenciación del gen EPG2 así como la construcción de cepas de levaduras que producen y secretan la enzima endopoligalacturonasa en gran cantidad y de forma muy estable. La enzima producida puede ser utilizada en la depectinización de zumos de frutas, verduras y hortalizas, la maceración de vegetales y el aumento del rendimiento en jugo, la formulación de piensos animales y la degradación de residuos vegetales.

ES 2 238 119 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de la enzima endopoligalacturonasa mediante el cultivo de cepas microbianas recombinantes que sobreexpresan el gen *EPG2* de *Kluyveromyces marxianus*.

Sector de la técnica

La presente invención describe la identificación y clonación en *Escherichia coli* del gen *EPG2* de *Kluyveromyces marxianus* que codifica la enzima endopoligalacturonasa. Asimismo describe la sobreexpresión del gen *EPG2* en levaduras con el fin de obtener una cepa que produzca la enzima endopoligalacturonasa en grandes cantidades.

Estado de la técnica

Las pectinas son polisacáridos de plantas formados por subunidades de ácido galacturónico unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y pueden estar esterificadas en mayor o menor grado con grupos metilo. Las enzimas capaces de degradar las pectinas se llaman pectinasas y se pueden clasificar en dos grupos: pectin esterases (en adelante PE) que liberan los grupos metilo de la pectina y depolimerasas que cortan los enlaces α -1,4 e incluyen a las pectin liasas (en adelante PL) y a las poligalacturonasas (en adelante PG). Las PG se dividen a su vez en endopoligalacturonasas (en adelante endoPG), que cortan en el interior de la molécula de pectina y exopoligalacturonasas (en adelante exoPG), que liberan unidades de ácido galacturónico en un extremo de la molécula (Forgarty y Kelly: 1983. Pectic enzymes. Applied Science Publishers, London pp 131-182; Rombouts y Pilnic. 1989. Pectic enzymes. Academic Press, London pp 227-282).

Las enzimas pécticas han encontrado un gran campo de aplicación en la industria alimentaria, sobre todo en el procesado de vegetales. Las pectinas causan serios problemas en la elaboración de diferentes bebidas de frutas, especialmente durante la clarificación y filtración de los productos, debido a que saturan y colmatan los filtros que se utilizan para llevar a cabo estos procesos. Entre las aplicaciones industriales más importantes de las pectinasas están la extracción y clarificación de zumos de frutas, sobre todo zumo de manzana, mosto de uva y aceite de oliva. Por otra parte, las pectinasas también pueden utilizarse, formando mezclas con otras hidrolasas, en la formulación de piensos animales y para la degradación de residuos vegetales (Blanco y col. 1999. FEMS Microbiol. Lett. 175: 1-9).

En la actualidad, la principal fuente de enzimas pécticas para la industria es el hongo *Aspergillus niger*. Los preparados comerciales obtenidos a partir de este hongo son una mezcla de las distintas enzimas pécticas (endo-, exo-PG, PL y PE), así como de otras enzimas producidas por el microorganismo, que pueden tener efectos indeseables sobre los productos tratados. Entre los efectos no deseables es importante destacar los que se derivan de la acción de las amilasas, las arabinofuranosidasas y sobre todo de las pectin esterases que liberan metanol al producto, compuesto altamente tóxico.

Por otra parte, se ha comprobado que las enzimas que tienen un mejor efecto sobre la depectinización, la reducción de viscosidad y la clarificación de zumos vegetales son las endoPG. Esta es la enzima que codifica el gen *EPG2*. En muchos casos estas enzimas por sí solas son suficientes para obtener el efecto deseado en el tratamiento del producto. En otros casos, la depectinización completa de ciertos sustratos solo se consigue mediante la acción conjunta de varios tipos de enzimas en la proporción correcta (Ceci y Lozano. 1998. Food Chem. 61: 237-241). Teniendo en cuenta lo expuesto, es de gran interés para la industria contar con las distintas enzimas pécticas por separado para poder utilizarlos solas (caso de las endoPG) o bien en mezclas con la proporción adecuada de cada tipo de enzima, según el sustrato sobre el que se vayan a utilizar.

La cepa obtenida mediante el procedimiento que se describe a continuación muestra la actividad endoPG más alta descrita hasta el momento en las cepas microbianas productoras de endoPG. La cepa puede crecer en medios de cultivo económicos y sintetiza la enzima de forma constitutiva, alcanzando el máximo de actividad a las 24 horas de crecimiento, antes que en cualquier otra cepa productora de esta enzima. Estos datos, unidos al hecho de que la cepa es muy estable, ya que el/los gen/es están integrados en el genoma de la misma, la convierten en una cepa apta para su explotación industrial.

Para obtener una cepa microbiana hiperproductora de la enzima endoPG, en primer lugar, el gen *EPG2* se aisló a partir de la cepa de CECT 1043 de *K. marxianus* y se clonó en *Escherichia coli* con el fin de secuenciarlo y facilitar su manipulación. A continuación se postuló la posibilidad de sobreexpresar dicho gen en un sistema heterólogo basado en levaduras hospedadoras (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*), que han dado buenos resultados para la expresión de diferentes hidrolasas ya que pueden producir y secretar de forma eficiente grandes cantidades de proteínas recombinantes (Buckholz y Gleeson. 1991. Biotechnology 9: 1067-1072; Domínguez et al. 1998. Int. Microbiol. 1:131-142). Con esta finalidad el gen *EPG2* se movilizó a un vector de expresión de levaduras que es utilizado para transformar a éstas y convertirlas en cepas que producen la enzima endoPG en gran cantidad.

En el siguiente ejemplo se detallan las investigaciones que conducen a la obtención de cepas hiperproductoras de endoPG.

Explicación de la invención

1.- *Clonación del gen EPG2 de Kluyveromyces marxianus en Escherichia coli*

5 El gen *EPG2* de *K marxianus* fue amplificado mediante PCR utilizando como molde el ADN de la cepa CECT 1043 y los oligonucleótidos KM1 (Secuencia 1) y KMIREV (Secuencia 2).

10 La extracción del ADN genómico de la cepa CECT 1043 se realizó según un protocolo convencional (Johnston. 1994. Molecular Genetics of Yeast. Oxford University Press). El programa utilizado para amplificación ha sido el siguiente:

	94°C 2 min (1 ciclo)	
15	94°C 1 min	} 30 ciclos
	55°C 1 min	
20	72°C 1 min	
	73°C 1 min (1 ciclo)	

25 El producto amplificado se visualizó mediante electroforesis, se recuperó a partir del gel de agarosa (Sambrook y col. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press) y se ligó al vector de clonación de *E. coli* pCR®-Blunt-II-TOPO (Invitrogen) utilizando el kit de clonación TOPO Cloning Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* TOP10 (Sambrook y col. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press) y los transformantes recombinantes se seleccionaron en
30 placas de LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%) suplementado con canarnicina (50 µg/mL). En una de estas colonias se comprobó la presencia del plásmido recombinante mediante PCR utilizando los dos oligonucleótidos y el programa descritos anteriormente. El ADN plasmídico de esta colonia se amplificó y se purificó utilizando el kit de extracción de plásmidos de Quiagen. A este plásmido se le dio el nombre de pSIVI30.

35 2.- *Secuenciación del fragmento de ADN clonado*

El fragmento de ADN clonado en el apartado 1 en el vector pCR®-Blunt-II-TOPO fue secuenciado utilizando el método de Sanger y col., 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467. Se obtuvo una secuencia de 1086
40 pares de bases (Secuencia 3) que fue analizada usando las bases de datos del servidor de acceso público BLAST del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI, USA). La secuencia muestra una alta homología con el gen *2EPG1* de *K. marxianus* que tiene 1083 pares de bases y también codifica una endoPG. La secuencia constituye un marco de lectura abierta (ORF) de 362 aminoácidos, uno más que la proteína codificada por el gen *EPG1*. El polipéptido deducido de la secuencia de bases clonada se muestra en el código de aminoácidos de tres letras en la Secuencia 4.

45 Puesto que el gen clonado tiene un aminoácido más que el previamente descrito *EPG1* (Scarcez, T. 1995. Sometido a las bases de datos EMBL/GenBank/DBJ), puede considerarse un nuevo alelo de *EPG1*, al que se le ha dado el nombre de *EPG2*. El aminoácido valina (posición 122) presente en Epg2p y ausente en Epg1p es el que diferencia los dos alelos. El análisis de la secuencia de aminoácidos muestra además que los primeros 25 aminoácidos de Epg2p
50 constituyen una secuencia señal, el centro activo está localizado en la región conservada entre los aminoácidos 218-230 y presenta dos sitios de glicosilación en los aminoácidos 188 y 292. En la Figura 1 se muestra un alineamiento de las proteínas Epg1p y Epg2p y se señalan las diferencias entre ambas.

La endoPG codificada por el gen *EPG2* muestra un 94.7% de identidad con la enzima codificada con el gen *EPG1* considerando toda la secuencia, un 59% con la endoPG de *Saccharomyces cerevisiae* y un 52% con la de *Aspergillus*
55 *niger*.

3.- *Clonación y expresión del gen EPG2 en la levadura Pichia pastoris*

60 Para la clonación y expresión del gen *EPG2* en *P. pastoris* se seleccionó el vector de expresión pGAPZαA (Invitrogen). Este plásmido permite la clonación del gen que se desea expresar, en fase con el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que asegura en muchos casos una excelente secreción al exterior de la proteína producida por la levadura. Los genes clonados en este plásmido se expresan bajo el control del promotor *GAP* lo que permite la síntesis constitutiva de la proteína. Por otra parte, el plásmido no se replica autónomamente y sólo puede transformar a las células de la levadura *P. pastoris* mediante integración en el genoma de la misma, por recombinación
65 homóloga. Esta integración puede producirse en varias copias. Como consecuencia se pueden obtener cepas que sintetizan proteínas de manera muy estable (ya que el gen integrado en el genoma no se pierde) y en gran cantidad (puesto que el gen puede integrarse en varias copias por célula).

ES 2 238 119 B1

El primer paso para la clonación del gen *EPG2* en el vector pGAPZ α A consistió en eliminar los primeros 25 aminoácidos de la proteína que constituyen el péptido señal nativo, con el fin de poder clonar la parte del gen que codifica la proteína madura en fase con la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae* que va incluida en el plásmido.

5 Para ello, el gen *EPG2* fue amplificado de nuevo mediante PCR utilizando como molde el ADN del plásmido pSIVI30 que lleva clonado el gen *EPG2* y los oligonucleótidos KM2 (Secuencia 2) y KM1REV (Secuencia 5). El programa utilizado para la amplificación fue el mismo que se describió en el apartado 1. El fragmento de ADN amplificado mediante estos oligonucleótidos carece del trozo que corresponde al péptido señal nativo de la enzima y posee las dianas para las enzimas de restricción *EcoRI* (en el extremo 5') y *XbaI* (en el extremo 3'). Este fragmento
10 se visualizó mediante electroforesis, se recuperó del gel de agarosa y se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* (Sambrook y col. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Por otra parte el vector pGAPZ α A fue también amplificado y purificado utilizando el kit de purificación de plásmidos de Quiagen. El vector purificado fue a continuación digerido con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y
15 *XbaI* y ligado al gen *EPG2* (Sambrook y col. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Con la mezcla de ligación se transformó la cepa de *E. coli* TOP10 (Sambrook y col. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press), y los transformantes recombinantes se seleccionaron en placas con medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.25%) suplementado con zeocina (25 μ g/mL), X-GAL (0.8 mg) e IPTG (5 μ L de solución 0.8M). A partir de una de estas colonias recombinantes de *E. coli* se amplificó y purificó el ADN plasmídico,
20 se denominó al nuevo plásmido pSIVI32, se digirió con la enzima de restricción *AvrII* y se utilizó para transformar las células de la levadura *P. pastoris*.

La transformación de la levadura silvestre *P. pastoris* X33 (Invitrogen) se llevó a cabo mediante electroporación siguiendo el protocolo descrito por Scorer y col. 1994, Bio/Technology 12: 181-184. Los transformantes se seleccionaron en medio YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) suplementado con zeocina (100 μ g/mL) ya que el plásmido pGAPZ α A confiere resistencia a este antibiótico.
25

A continuación se seleccionaron al azar 4 colonias resistentes a zeocina y mediante PCR, usando los oligonucleótidos KM2 (Secuencia 2) y KM1REV (Secuencia 5) y el programa de amplificación ya descrito en el apartado 1, se comprobó que portaban en su genoma el gen *EPG2*. Estas cuatro cepas de *P. pastoris* denominadas SIVI30, SIVI31, SIVI32 y SIVI33 fueron utilizadas para probar su capacidad para producir la enzima endoPG. En la Figura 2 se muestra el proceso de obtención de cepas hiperproductoras de la enzima endopoligalacturonasa.
30

4.- Producción de la enzima endoPG por parte de las cepas SIVI30, SIVI31, SIVI32 y SIVI33 de *Pichia pastoris*

35 Las cuatro cepas de *P. pastoris* seleccionadas que expresan el gen *EPG2*, se sembraron en matraces de 1 L que contenían 100 mL de medio YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) y se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 72 horas. A lo largo de este tiempo se fueron tomando muestras cada 6 horas en las que se determinó la actividad enzimática. La actividad endoPG se valoró en los sobrenadantes de los medios de cultivo utilizando el método de Somogyi (Somogyi. 1952. J. Biol. Chem. 159: 19-23) modificado por Nelson (Nelson. 1957. Methods in Enzymology 3: 85-86). Los sobrenadantes se centrifugaron, se filtraron a través de membranas de 0.22 μ m y se dializaron en tampón acético-acetato 50 mM pH 5 y se utilizaron para determinar la actividad enzimática. Las reacciones enzimáticas contenían 0.5 mL de enzima (sobrenadante centrifugado y dializado) y 0.5 mL de sustrato (ácido poligalacturónico al 0.5% en tampón acético-acetato 50 mM, pH 5). Se definió la unidad enzimática como la
40 cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido galacturónico, o su equivalente en poder reductor, en 1 min a 37°C.
45

La máxima actividad enzimática se alcanzó en todas las cepas al cabo de 24 h, sin embargo, la cantidad de enzima producida variaba dependiendo de la cepa probada. Este dato es consecuente con el hecho de que el número de copias del gen integradas en el genoma de cada clon puede variar. En la Tabla 1 se muestran los datos de la actividad enzimática máxima encontrados para cada una de las cepas probadas: 3.6 U/mL para la cepa SIVI30, 3.7 U/mL para la cepa SIVI31, 5.3 U/mL para la cepa SIVI32 y 8 U/mL para la cepa SIVI33 (CECT 11779).
50

TABLA 1

55 *Actividad enzimática de cuatro clones de la cepa X33 transformada con el plásmido pSIVI32*

Cepas	Actividad enzimática (U/mL)*
Cepa X33 no transformada	0
SIVI30	3.6
SIVI31	3.7
SIVI32	5.3
SIVI33	8

ES 2 238 119 B1

De las cuatro cepas se seleccionó, para su explotación industrial, la cepa SIVI33 por ser la que produce la mayor cantidad de enzima endoPG y se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot (Valencia) con la referencia CECT 11779. La producción de la enzima en esta cepa es una característica muy estable ya que el/los gen/es que la sintetizan están integrados en el genoma de la levadura y se expresan sin necesidad de utilizar medios definidos o añadir antibióticos para mantener la presión selectiva. En consecuencia, la cepa puede crecer sin ningún problema en los medios económicos que se utilizan para la producción industrial.

Descripción de las figuras

Figura 1: Alineamiento de las proteínas codificadas por los genes *EPG1* y *EPG2* de *Kluyveromyces marxianus*. Se señalan en negrita los aminoácidos que difieren entre las dos proteínas. El aminoácido que diferencia los dos alelos está situado en la posición 122.

Figura 2: Esquema del proceso de obtención de la cepa CECT 11779 de *Pichia pastoris* que produce la enzima endoPG, mediante la expresión del plásmido pSIVI32 consistente en el gen *EPG2* de *Kluyveromyces marxianus* clonado en el vector pGAPZ α A de *Pichia pastoris*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de obtención de la enzima endopoligalacturonasa mediante el cultivo de cepas microbianas recombinantes que sobreexpresan el gen *EPG2* de *Kluyveromyces marxianus*.
2. Una secuencia de ADN identificada como Secuencia 3, según la reivindicación 1, **caracterizada** por contener el gen *EPG2* de *Kluyveromyces marxianus*.
- 10 3. Un polipéptido identificado como Secuencia 4, **caracterizado** por estar codificado por la Secuencia 3, según la reivindicación 2, y presentar actividad endopoligalacturonasa.
4. Vectores bacterianos **caracterizados** por consistir en plásmidos que portan la Secuencia 3 de ADN, según la reivindicación 2, o fragmentos de la misma.
- 15 5. Vectores de levaduras **caracterizados** por consistir en plásmidos que portan la Secuencia 3 de ADN, según la reivindicación 2, o fragmentos de la misma.
- 20 6. Plásmido pSIVI30 **caracterizado** por consistir en el plásmido pCR[®] Blunt-II-TOPO de *Escherichia coli* que contiene la Secuencia 3 de ADN, según la reivindicación 2.
7. Plásmido pSIVI32 **caracterizado** por consistir en el plásmido pGAPZ α A de *Pichia pastoris* que contiene un fragmento de la Secuencia 3 de ADN, según la reivindicación 2, que codifica la proteína madura funcional.
- 25 8. Microorganismos recombinantes, según la reivindicación 1, **caracterizados** por consistir en una levadura hospedadora perteneciente a la especie *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe* transformada con los plásmidos de las reivindicaciones 5 ó 7.
- 30 9. Levadura recombinante depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de registro CECT 11779 **caracterizada** por consistir en la cepa X33 de *Pichia pastoris* transformada con el plásmido de la reivindicación 7.
10. La utilización de la cepa CECT 11779, según la reivindicación 9, para producir la enzima endopoligalacturonasa.
- 35 11. La utilización de la enzima endopoligalacturonasa, según la reivindicación 10, para la depectinización y clarificación de zumos de frutas, verduras y hortalizas, la maceración de vegetales y el aumento del rendimiento en la obtención de jugo, la formulación de piensos y la degradación de residuos vegetales.

40

45

50

55

60

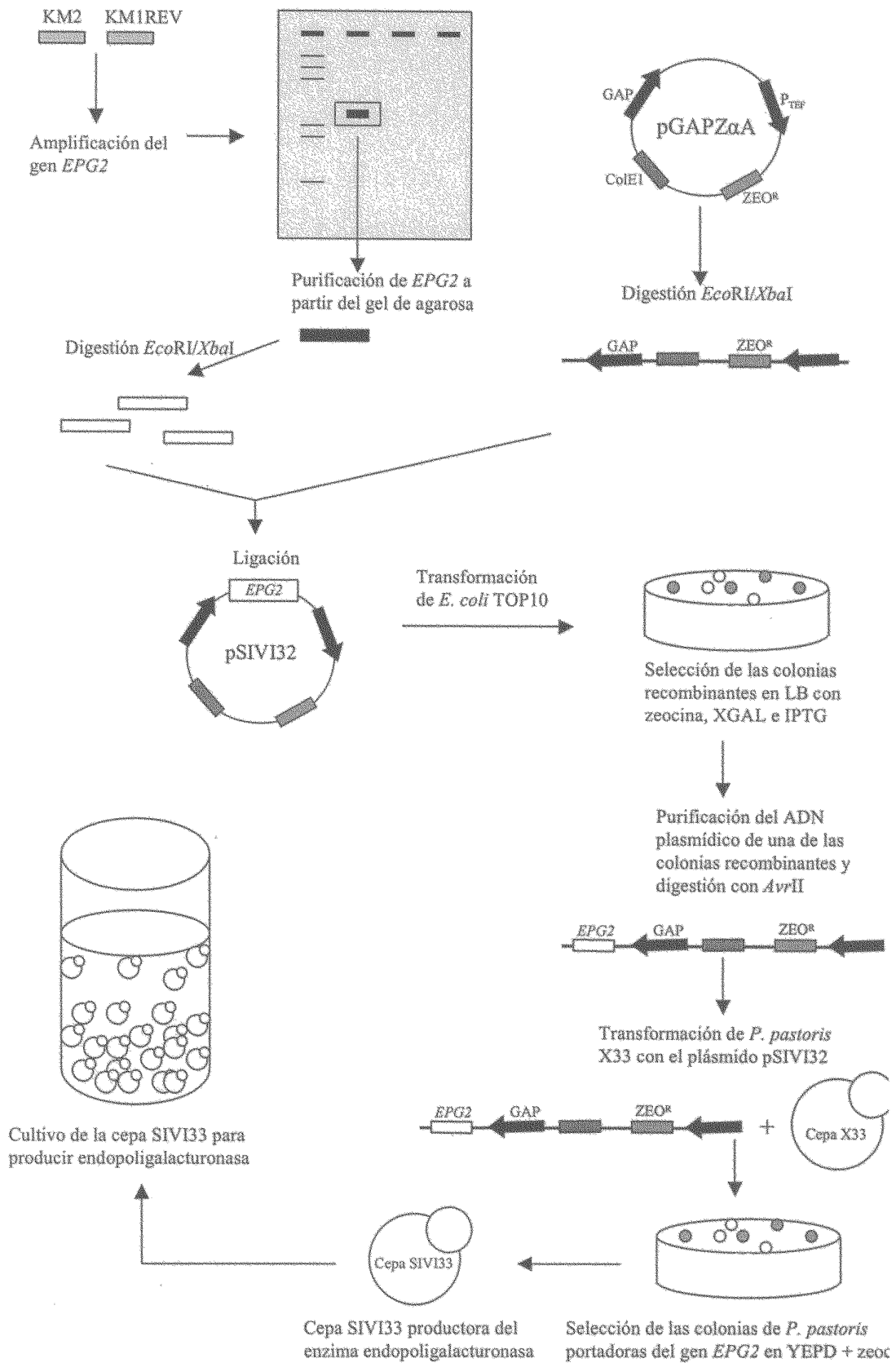
65

ES 2 238 119 B1

Figura 1

Epg2p	MLFSNTLLIA	AASALLAEAS	PLEKRDCTL	SGKTAGGGLS	NCATVTVNNV	EVPSGKTLDL
Epg1p	MLFSNTLLIA	AASALLAEAS	PLEKRDCTL	SGKTAGGGLS	NCATVTVNNV	EVPSGKTLDL
	61					120
Epg2p	TGLQDGATVN	FVGQVTFD Y D	EWVGPLVSIS	GNNIKVVGKS	GHLLDGDGAR	WWDGKGD S GK
Epg1p	TGLPDGATVN	FVGQVTF G YD	EWVGPLVSIS	GNNIKVVGKS	GHLLDGDGAR	WWDGKGD G GK
	121					180
Epg2p	KVKPKFMSL K	LTGNSDVGGL	QIKNTPIQAI	SVNSCSDTVI	HDVTIDN S DG	DKD S LGHN T D
Epg1p	K-KPKFMSL R	LTGNSDVGGL	QIKNTPIQAI	SVNSCSDTVI	HDVTIDN R DG	DKD N LGHN T D
	181					240
Epg2p	GFDVGS V NNV	TIENCHVYNQ	DDCIAVNSGT	GVYFKNNYCS	GGHGASIGSV	GLRSNNV V DT
Epg1p	GFDVGN V NNV	TIENSHVYNQ	DDCIAVNSGT	GVYFKNNYCS	GGHGASIGSV	GLRSNNV V DT
	241					300
Epg2p	VYFENNQIVN	SDNGLRIKTI	QKATGSVNNV	HFLSNTISGI	RKFGIVVETD	YSNGSTT G TP
Epg1p	VYFENNQIVN	SDNGLRIKTI	QKATGSVNNV	HFLSNTISGI	RKFGIVVETD	YSNGSTT G TP
	301					360
Epg2p	GSKVPITNFE	VDGLTGSVDS	SAYRVKILVA	GASKWTWKDV	DITGG C SFGS	CTGIPSGSGA
Epg1p	GSKVPITNFE	VDGLTGSVDS	SAYRVKI F VVA	GASKWTWKNV	DITGG S SFGS	CTGIPSGSGA
	361					
Epg2p	FC					
Epg1p	FC					

Figura 2



ES 2 238 119 B1

<400> 3

5	atgttattca gcaacacctt attgatcgca gcagctagtg cattattagc tgaagcttct	60
	ccattggaaa agagagacag ttgtaccttg agtgggaaga cagccggagg tggtttgccc	120
	aactgtgcca cggtcactgt caacaacgtc gaagtcccat ctggtaagac tttggacttg	180
10	acaggcttgc aagacggtgc gacagttaat ttcgctgggc aggttacctt tgattacgat	240
	gaatgggtgg gtccattggt ctccatctcc ggtaacaaca tcaaggtggt aggtaaatct	300
15	ggccacttgt tagatggtga tggtgcacgt tgggggacg ggaaggtgga cagtggtaaa	360
	aaggtgaagc ctaagttcat gagcttgaaa ttgactggca actcagatgt cggtgggttg	420
20	caaatcaaga atacccaat tcaagctatc tcagtgaact cttgtagtga cactgtaatt	480
	cacgatgtca ccattgacaa cagtgatggt gacaaggaca gcttgggtca caaactgac	540
25	ggtttcgatg ttggtagcgt taacaacgtc accattgaga actgtcatgt ctacaaccaa	600
	gatgactgta tcgccgtcaa ctccggtacc ggtgtctact tcaagaacaa ctactgttct	660
30	ggtggtcatg gtgcttccat tggttcagtc ggtcttcgct caaacaatgt ggttgacacc	720
	gtttacttcg agaacaacca aattgtcaac tctgacaacg gtttgagaat taagaccatt	780
35	caaaaggcca ctggttccgt caacaacgtc cacttcttgt ccaaacctat ctccggcatc	840
	agaaagttcg gaattgttgt tgaaactgat tacagcaatg gatccaccac cggtagccca	900
40	ggtagcaagg tccaatcac caacttcgaa gtcgatggtt tgactggttc agttgactct	960
	tccgcttaca gagtcaagat cttggttgct ggtgcttcta agtggacttg gaaggatggt	1020
45	gatatacactg gtggttggtc tttcggttca tgtactggta ttccatctgg tagcggagcc	1080
	ttctgt	1086

<210> 4

<211> 362

50 <212> PRT

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<220>

55 <221> Polipéptido

<222> (1)..(362)

<223> Secuencia de aminoácidos correspondiente al precursor de la enzima endopoligalacturonasa codificada por el gen EPG2 de *Kluyveromyces marxianus*

60

65

ES 2 238 119 B1

<400> 4

	Met	Leu	Phe	Ser	Asn	Thr	Leu	Leu	Ile	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Leu	Leu
	1				5					10					15	
5	Ala	Glu	Ala	Ser	Pro	Leu	Glu	Lys	Arg	Asp	Ser	Cys	Thr	Leu	Ser	Gly
				20					25					30		
10	Lys	Thr	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Asn	Cys	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Asn
			35					40					45			
15	Asn	Val	Glu	Val	Pro	Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln
		50					55					60				
20	Asp	Gly	Ala	Thr	Val	Asn	Phe	Val	Gly	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Tyr	Asp
	65					70					75				80	
25	Glu	Trp	Val	Gly	Pro	Leu	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Asn	Asn	Ile	Lys	Val
					85					90				95		
30	Val	Gly	Lys	Ser	Gly	His	Leu	Leu	Asp	Gly	Asp	Gly	Ala	Arg	Trp	Trp
				100					105					110		
35	Asp	Gly	Lys	Gly	Asp	Ser	Gly	Lys	Lys	Val	Lys	Pro	Lys	Phe	Met	Ser
			115					120					125			
40	Leu	Lys	Leu	Thr	Gly	Asn	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Leu	Gln	Ile	Lys	Asn
		130					135					140				
45	Thr	Pro	Ile	Gln	Ala	Ile	Ser	Val	Asn	Ser	Cys	Ser	Asp	Thr	Val	Ile
	145					150					155					160
50	His	Asp	Val	Thr	Ile	Asp	Asn	Ser	Asp	Gly	Asp	Lys	Asp	Ser	Leu	Gly
					165					170					175	
55	His	Asn	Thr	Asp	Gly	Phe	Asp	Val	Gly	Ser	Val	Asn	Asn	Val	Thr	Ile
				180					185					190		
60	Glu	Asn	Cys	His	Val	Tyr	Asn	Gln	Asp	Asp	Cys	Ile	Ala	Val	Asn	Ser
			195				200						205			
65	Gly	Thr	Gly	Val	Tyr	Phe	Lys	Asn	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Gly	His	Gly
		210				215						220				
70	Ala	Ser	Ile	Gly	Ser	Val	Gly	Leu	Arg	Ser	Asn	Asn	Val	Val	Asp	Thr
	225					230					235					240
75	Val	Tyr	Phe	Glu	Asn	Asn	Gln	Ile	Val	Asn	Ser	Asp	Asn	Gly	Leu	Arg
					245					250					255	
80	Ile	Lys	Thr	Ile	Gln	Lys	Ala	Thr	Gly	Ser	Val	Asn	Asn	Val	His	Phe
				260					265					270		
85	Leu	Ser	Asn	Thr	Ile	Ser	Gly	Ile	Arg	Lys	Phe	Gly	Ile	Val	Val	Glu
			275					280					285			
90	Thr	Asp	Tyr	Ser	Asn	Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Lys	Val
	290						295					300				

ES 2 238 119 B1

Pro Ile Thr Asn Phe Glu Val Asp Gly Leu Thr Gly Ser Val Asp Ser
305 310 315 320

5 Ser Ala Tyr Arg Val Lys Ile Leu Val Ala Gly Ala Ser Lys Trp Thr
325 330 335

10 Trp Lys Asp Val Asp Ile Thr Gly Gly Cys Ser Phe Gly Ser Cys Thr
340 345 350

15 Gly Ile Pro Ser Gly Ser Gly Ala Phe Cys
355 360

<210> 5

<211> 28

20 <212> DNA

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<220>

25 <221> Oligonucleótido

<222> (1)..(28)

<223> Oligonucleotido deducido a partir de la secuencia de bases del gen EPG2 de *Kluyveromyces marxianus*

30 <400> 5

gaattcgaca gttgtacctt gactggga

28

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 238 119

② Nº de solicitud: 200202566

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.11.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/56, 9/26

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SIEKSTELE, R. et al. "Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the Kluyveromyces marxianus endopolygalacturonase gene (EPG1)", YEAST, 1999, Vol. 15, páginas 311-322. Ver todo el documento.	1-11
Y	BARNBY, F.M. et al. "Endopolygalacturonase production from Kluyveromyces marxianus. I. Resolution, purification, and partial characterisation of the enzyme", ENZYME MICROB. TECHNOL., 1990, Vol. 12, páginas 891-897. Ver todo el documento.	1-11
A	SMITH, A.B. et al. "Two-dimensional electrophoretic analysis of endopolygalacturonases produce by Kluyveromyces marxianus", JOURNAL OF FOOD BIOCHEMISTRY, 1990, Vol. 14, Nº 4, páginas 273-281. Ver todo el documento.	1-11
A	JIANHUA, J. et al. "Endopolygalacturonase genes and enzymes from Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces marxianus", CURRENT GENETICS, 2000, Vol. 38, Nº 5, páginas 264-270. Ver todo el documento.	1-11
A	BLANCO, P. et al. "Mutagenesis of key amino acids alters activity of a Saccharomyces cerevisiae endo-polygalacturonase expressed in Pichia pastoris", FEMS MICROBIOL. LETT., 2002, Vol. 210, Nº 2, páginas 187-191. Ver todo el documento.	1-11

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
08.07.2005

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1