

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 684**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435	(2006.01)
C12N 9/16	(2006.01)
C12P 19/00	(2006.01)
C12N 9/18	(2006.01)
C12P 7/62	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C12P 7/40	(2006.01)
A23L 29/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2015 PCT/EP2015/068800**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16026793**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2015 E 15750745 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3183263**

54 Título: **Enzimas con actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa**

30 Prioridad:

22.08.2014 EP 14182006

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.03.2021

73 Titular/es:

**STERNENZYM GMBH & CO. KG (100.0%)
Kurt-Fischer-Straße 55
22926 Ahrensburg, DE**

72 Inventor/es:

**NIETER, ANNABEL;
LINKE, DIANA;
BERGER, RALF GÜNTER;
THIESING, DAVID y
POPPER, LUTZ**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 813 684 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Enzimas con actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa

- 5 **[0001]** Se describen enzimas que tienen actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa, es decir, que tienen actividad de hidrólisis y síntesis de ácido clorogénico y ésteres de ácido hidroxicinámico, obtenidas de los basidiomicetos *Ustilago maydis* (UmChIE), *Rhizoctonia solani* (RsChIE), *Schizophyllum commune* (ScFae1 y ScFae3) y derivados de los mismos, respectivamente. Se describen ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, así como procedimientos para preparar y usar la
- 10 enzima, p. ej., sobre sustratos sintéticos, así como naturales complejos, tales como pectina de remolacha azucarera, salvado de trigo desalmidonado y pulpa de café. Se describe el uso de enzimas que tienen actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, en particular, enzimas con tales actividades obtenidas de basidiomicetos, para el reblandecimiento de masas, así como productos alimenticios que comprenden dichas enzimas.
- 15 **[0002]** Las paredes celulares de las plantas consisten en un conjunto complejo de polisacáridos que incluyen celulosa, hemicelulosa y pectina. Esta red de polisacáridos forma estructuras tridimensionales que contienen hidroxicinamatos con enlaces éster (1). Estos ácidos fenólicos (ácido cafeico, ferúlico y p-cumárico) afectan no solo a la rigidez y las propiedades mecánicas de la pared celular, sino que también juegan un papel en la defensa de las plantas (2). Están enlazados de manera diferente a residuos de azúcares en las plantas: (A) en gramíneas tales como
- 20 trigo, cebada o maíz, los ferulatos y p-cumaratos se encuentran principalmente esterificados a la posición O-5 de los residuos de arabinosa, mientras que (B) en la pectina de las dicotiledóneas, tales como espinaca o remolacha azucarera, el ácido ferúlico está esterificado a la posición O-2 de los residuos de arabinosa y a la posición O-6 de los residuos de galactosa (3). Asimismo, los hidroxicinamatos también existen como conjugados de ésteres solubles de ácido quínico, siendo el ejemplo más conocido el ácido clorogénico (4). Hay presentes concentraciones
- 25 particularmente altas de ácido clorogénico en el café, la manzana, la pera y el tubérculo de patata (4). Especialmente las industrias sanitaria, cosmética y farmacéutica están interesadas en los hidroxicinamatos debido a sus propiedades anticarcinogénicas, antiinflamatorias y antioxidantes (5). Por consiguiente, las enzimas capaces de liberar estos compuestos fenólicos son de especial interés para su posible uso industrial y médico.
- 30 **[0003]** Un grupo de estas enzimas son las feruloil esterases (FAE; EC 3.1.1.73), una subclase de las hidrolasas de éster carboxílico (EC 3.1.1). Estas hidrolizan el enlace éster entre el ácido ferúlico o ácidos cinámicos relacionados y los polisacáridos complejos de la pared celular de las plantas (6). A lo largo de los años, se aisló y caracterizó un gran número de FAE, principalmente a partir de bacterias, levaduras y hongos (7-10). Crepin y col. (10) desarrollaron un sistema de clasificación para las FAE dividiéndolas en cuatro tipos (A-D) en base a su especificidad de sustrato
- 35 soportada por la identidad de secuencia primaria. Las FAE de Tipo A son activas sobre ferulato de metilo (MFA), p-cumarato de metilo (MpCA), sinapato de metilo (MSA), pero no sobre cafeato de metilo (MCA). Por el contrario, las FAE de Tipo B hidrolizan MFA, MpCA y MCA, mientras que las Tipo C y D actúan sobre los cuatro sustratos. Solo el Tipo A y D son capaces de liberar diferulatos de sustratos complejos.
- 40 **[0004]** Sin embargo, había tan solo unos cuantos estudios que se centraron en la ácido clorogénico hidrolasa (EC 3.1.1.42). Hasta la fecha, se ha publicado un número pequeño de ácido clorogénico esterases, todas de *Aspergillus* sp. Schobel y Pollmann (11, 12) aislaron y caracterizaron parcialmente un ácido clorogénico esterasa específica a partir de una preparación de enzima pectinolítica de *Aspergillus niger*. Más recientemente, Asther y col. (13) demostraron la eficacia de otra enzima de *A. niger* para liberar ácido cafeico a partir de subproductos industriales
- 45 tales como pulpa de café y orujo de manzana. El gen correspondiente fue sobreexpresado homogéneamente por Benoit y col. (14), y se compararon las propiedades de la enzima recombinante y natural. Adachi y col. indujeron un ácido clorogénico esterasa en micelios de *Aspergillus sojae* indistintamente con café en polvo o pulpa de café (15). Un éster de ácido hidroxicinámico hidrolasa de *Aspergillus japonicus* (16) y una cinamato esterasa de *A. niger* (17) también hidrolizaban el ácido clorogénico. Adicionalmente, se demostró actividad frente al ácido clorogénico para la feruloil esterasa FAEB de *A. niger* (18), AoFaeB y AoFaeC de *Aspergillus oryzae* (19), TsFaeC de *Talaromyces stipitatus* (20) y Fae1A de *Anaeromyces mucronatus* (21). Couteau y col. (22) aislaron y caracterizaron bacterias
- 50 colónicas humanas que actúan sobre el ácido clorogénico.
- [0005]** A la vista de esto, los inventores solucionaron el problema de proporcionar una nueva enzima que tenga
- 55 actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa con características y especificidad de sustrato alternativas que se pueda usar, p. ej., para generar los productos correspondientes. Por ejemplo, el hidroxicinamato puede ser liberado de subproductos industriales. Asimismo, sorprendentemente encontraron nuevas aplicaciones de las enzimas que tienen actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, en particular, actividad ácido clorogénico esterasa, en la el horneado.
- 60 **[0006]** Este problema se soluciona, p. ej., con la materia de las reivindicaciones.
- [0007]** La presente descripción proporciona usos específicos de una enzima que tiene actividad fenilpropanoide esterasa, así como enzimas fenilpropanoide esterases específicas. En particular, la descripción proporciona usos
- 65 específicos de una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que comprende una

secuencia que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1.

[0008] La descripción proporciona una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que comprende

- a. una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 y que no comprende la SEQ ID NO: 3, o
- b. una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 y que no comprende la SEQ ID NO: 19, o
- c. una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22, o
- d. una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26, o
- e. una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 30.

[0009] La enzima comprende preferentemente una secuencia que tiene la SEQ ID NO: 1, y se designa UmChIE. También puede consistir en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 1 no comprende la secuencia de señalización endógena de SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, es la secuencia de longitud completa de UmChIE proporcionada por los inventores (SEQ ID NO: 17), que incluye la secuencia señal. En una realización, la presente descripción no cubre una enzima que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (Um00182.1, n.º de entrada de GenBank **XP_756329.1**). Una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que comprende una secuencia que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 puede comprender también una leucina en la posición 492 de la secuencia (calculada con respecto a las posiciones en la SEQ ID NO: 19).

[0010] Preferentemente, la enzima tiene actividad ácido clorogénico esterasa, más preferentemente, la enzima tiene actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa, en particular actividad feruloil esterasa de tipo B (Crepin y col., 2004). Preferentemente, la actividad de la enzima es comparable (p. ej., al menos 70 % de actividad, al menos 80 % de actividad o al menos 90 % de actividad) a la actividad sobre al menos un sustrato diferente como se muestra para UmChIE, preferentemente, sobre todos los sustratos investigados en el Ejemplo 1.

[0011] Sorprendentemente, los inventores detectaron actividad ácido clorogénico esterasa en un basidiomiceto, *Ustilago maydis*, y fueron capaces de aislar la enzima responsable, UmChIE, a pesar de los problemas con la producción de melanina cuando se usaba medio de nutrición estándar. Solo ciertas condiciones de cultivo específicas, que inducían actividades esterasa superiores y evitaban la producción de melanina, permitieron la purificación de la enzima. Se encontró que la enzima tiene una especificidad de sustancia excepcionalmente amplia, ya que tiene actividad feruloil esterasa además de actividad ácido clorogénico esterasa. La enzima se secuenció y caracterizó por completo.

[0012] La masa molecular de la enzima novedosa, como se determina mediante SDS-PAGE desnaturante, es preferentemente 71 kDa, como se muestra para el ácido clorogénico esterasa aislada de *U. maydis* (Fig.1, carril 2). La masa aparente de la enzima natural estimada mediante cromatografía de exclusión molecular demuestra que UmChIE es un monómero. UmChIE difiere, por tanto, de las otras enzimas ácido clorogénico esterasas descritas en la bibliografía. Mientras que Asther y col. (13) y Adachi y col. (15) identificaron las ácido clorogénico hidrolasas naturales como homodímeros de aproximadamente 2 x 80 kDa, Benoit y col. (14) sugirió que la enzima de *A. niger* recombinante existe como una forma tetramérica. Schobel y Pollmann (12) caracterizaron la segunda ácido clorogénico esterasa conocida de *A. niger* también como un tetrámero (4 x 60 kDa), mientras que Okamura y Watanabe (16) describieron la éster de ácido hidroxicinámico hidrolasa de *A. japonicus* como un monómero de 145 kDa.

[0013] La secuencia corresponde en gran medida a la proteína hipotética Um00182.1 (SEQ ID NO: 19) de *U. maydis* 521 (n.º de entrada de GenBank **XP_756329.1**), que fue comentada mediante un proyecto genómico y clasificada aproximadamente como un miembro de la superfamilia de esterasas-lipasas que contiene una región específica para las carboxilesterasas. No se disponía de información adicional sobre esta secuencia antes de la presente invención, p. ej., no hay indicios de que la proteína se hubiera preparado y aislado nunca, y no había información sobre su glicosilación o sobre su actividad enzimática real.

[0014] La secuencia codificante completa de UmChIE, como la proporcionan los inventores, tiene una longitud de 1758 pb, lo que corresponde a una proteína de 585 aminoácidos (aa). La secuencia de aa completa de UmChIE (SEQ ID NO: 17) purificada a partir de *U. maydis* por los inventores posee tres diferencias a nivel de nucleótidos que conducen a un cambio a nivel de nucleótidos en la posición 492 (prolina a leucina) en comparación con la secuencia de Um00182. La secuencia de UmChIE presentó la similitud (89 %) e identidad (81 %) máximas con una carboxilesterasa de *Pseudozyma hubeiensis* SY62 (n.º de entrada de GenBank **GAC96757**). Por el contrario, solo se obtuvo 29 % de identidad con una secuencia de aa del ácido clorogénico hidrolasa CHIE de *A. niger* (n.º de entrada de GenBank **DQ993161**). Se identificó un péptido señal de 21 aa en el extremo amino de la secuencia de UmChIE en

base a la predicción usando el programa en red SignalP 4.01. Se calculó que la masa molecular prevista de la proteína madura es 63,7 kDa usando la herramienta Compute p/Mw de ExPASy. La discrepancia con la masa molecular deducida a partir de SDS-PAGE desnaturizante (71 kDa) indicó una proteína glicosilada. Se identificaron nueve posibles sitios de *N*-glicosilación en las posiciones 5, 109, 151, 298, 308, 370, 387, 487 y 558 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). El tratamiento con endoglicosilasa H da como resultado una proteína desglucosilada de aproximadamente 63 kDa (Fig. 1, carril 3), lo que sugiere que la UmChIE contiene oligosacáridos con alto contenido de manosa enlazado a Asn. Se describieron resultados similares para la ácido clorogénico hidrolasa CHIE de *A. niger* (14). Para CHIE, la glicosilación provocó una diferencia de masa de 25 kDa. Por consiguiente, UmChIE tiene un grado de *N*-glicosilación inferior a CHIE. Esto también explica la termolabilidad de UmChIE mostrada más adelante, ya que se ha descrito que la *N*-glicosilación es importante no solo para el plegamiento proteico, sino también para la termoestabilidad (55).

[0015] La secuencia de la UmChIE contiene un motivo G-X-S-X-G (Fig. 3) característico de la familia de las serina esterases (56, 57). Aquí, el motivo G-Q-S-A-G es el mismo que en la secuencia de CHIE. Este motivo también se encontró en las feruloil esterases de *P. eryngii* PeFaeA (29) y *P. sapidus* Est1 (25), mientras que otra feruloil esterasa a menudo posee G-H-S-L-G y G-C-S-T-G como motivos conservados (19, 58). La tríada catalítica de UmChIE está previsto que consista en Ser228, Glu360 e His497 (http://pfam.sanger.ac.uk/). Asimismo, CHIE contiene una tríada catalítica de Ser-Glu-His, mientras que el ácido clorogénico esterasa de *N. crassa* (n.º de entrada de GenBank **EAA32507.3**) comentada presentaba el ácido glutámico sustituido por ácido aspártico (Fig. 3). Udatha y col. (48) describieron una tríada catalítica de Ser-Asp-His para 324 secuencias de feruloil esterases analizadas. No obstante, también se conocían dos feruloil esterases que contenían una tríada catalítica de Ser-Glu-His (25, 29). Por consiguiente, en base a la secuencia, no se podría haber previsto que la UmChIE es una ácido clorogénico esterasa.

[0016] La enzima puede tener una o más de las características siguientes, preferentemente, todas las características enumeradas en a) a j), opcionalmente, todas ellas:

- a) no glicosilada o glicosilada en los sitios de *N*-glicosilación 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9;
- b) monomérica;
- c) actividad ácido clorogénico esterasa a aproximadamente pH 3-10;
- d) pH óptimo de actividad ácido clorogénico esterasa a aproximadamente pH 5,5-9,5, lo más preferentemente a aproximadamente pH 7,5;
- e) estabilidad a pH 4-10;
- f) actividad feruloil esterasa sobre los sustratos p-cumarato de metilo, ferulato de metilo y cafeato de metilo, pero no sinapato de metilo;
- g) *p*_i de aproximadamente 3,0;
- h) estabilidad térmica hasta aproximadamente 40 °C;
- i) actividad óptima a aproximadamente 37 °C;
- j) actividad óptima a aproximadamente NaCl 0,1-3 M, preferentemente, NaCl 1-3 M o aproximadamente NaCl 3 M;
- y/o
- k) que comprende una cola de afinidad adecuada para la purificación, tal como una cola de His, preferentemente, en el extremo carboxilo.

[0017] En el contexto de la invención, el término “aproximadamente” está destinado a ser entendido como “+/- 10 %”. Si “aproximadamente” se refiere a un intervalo, se refiere tanto al límite inferior como superior del intervalo. “Un/a” está destinado a significar “uno/a o más”, si no se menciona explícitamente de otro modo.

[0018] En otra realización, opción c anterior, la enzima comprende preferentemente una secuencia que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22 o, preferentemente, que tiene la SEQ ID NO: 22. La enzima que tiene la SEQ ID NO: 22 se designa RsChIE. También puede consistir en la SEQ ID NO: 22. En algunas realizaciones, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 22 no comprende la secuencia de señalización endógena que está comprendida adicionalmente en la SEQ ID NO: 23. En otras realizaciones, comprende la secuencia de longitud completa de RsChIE proporcionada por los inventores (SEQ ID NO: 23), que incluye la secuencia señal.

[0019] Preferentemente, la enzima tiene actividad ácido clorogénico esterasa, más preferentemente, la enzima tiene actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa, en particular, actividad feruloil esterasa de tipo B. Preferentemente, la actividad de la enzima es comparable (p. ej., al menos 70 % de actividad, al menos 80 % de actividad o al menos 90 % de actividad) a la actividad sobre al menos un sustrato como se muestra para RsChIE, preferentemente, sobre todos los sustratos investigados en el Ejemplo 2.

[0020] Tras haber encontrado actividad ácido clorogénico esterasa en el basidiomiceto *Ustilago maydis*, y ser capaces de aislar la enzima responsable, UmChIE, investigaron un basidiomiceto adicional, *Rhizoctonia solani*, para determinar la presencia de un ácido clorogénico esterasa y amplificar satisfactoriamente su secuencia. Se encontró que la enzima, RsChIE, tiene una especificidad de sustancia excepcionalmente amplia, comparable a UmChIE, ya que

tiene actividad feruloil esterasa además de actividad ácido clorogénico esterasa. La enzima se secuenció y caracterizó por completo.

[0021] La masa molecular de la enzima novedosa obtenida de RsChIE, como se determina mediante SDS-PAGE desnaturalizante, es preferentemente aproximadamente 70 kDA.

[0022] La secuencia codificante completa de RsChIE, como la proporcionan los inventores, tiene una longitud de 1692 pb, lo que corresponde a una proteína de 563 aminoácidos (aa). Se identificó un péptido señal de 38 aa en el extremo amino de la secuencia de RsChIE. Se calculó que la masa molecular prevista de la proteína madura es 56,9 kD usando la herramienta Compute p//Mw de ExPASy. La discrepancia con la masa molecular deducida a partir de SDS-PAGE desnaturalizante (70 KD) indicó una proteína glicosilada.

[0023] La enzima que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22 puede tener una o más de las características siguientes, preferentemente, todas las características enumeradas en a) a g):

- a) glicosilación;
- b) actividad ácido clorogénico esterasa a aproximadamente pH 3-7,5;
- c) pH óptimo de actividad ácido clorogénico esterasa a aproximadamente pH 5,5-6,5, lo más preferentemente a aproximadamente pH 6;
- d) actividad feruloil esterasa sobre los sustratos *p*-cumarato de metilo, ferulato de metilo y cafeato de metilo, pero no sinapato de metilo;
- e) estabilidad térmica hasta aproximadamente 40 °C;
- f) actividad óptima a aproximadamente 30 °C; y/o
- g) que comprende una cola de afinidad adecuada para la purificación, tal como una cola de His, preferentemente, en el extremo carboxilo.

[0024] Los inventores identificaron y prepararon enzimas adicionales de *S. commune*. Sorprendentemente, encontraron que estas enzimas, ScFae1 y ScFae3, también tenían ambas actividad feruloil esterasa y actividad ácido clorogénico esterasa. Por tanto, en otra realización, opciones d y e anteriores, la enzima comprende preferentemente una secuencia que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 o 30. Preferentemente, tiene la SEQ ID NO: 26 o 30. La enzima que tiene la SEQ ID NO: 26 se designa ScFae1. También puede consistir en la SEQ ID NO: 26. La enzima que tiene la SEQ ID NO: 30 se designa ScFae3. También puede consistir en la SEQ ID NO: 30. En algunas realizaciones, la enzima que comprende la SEQ ID NO: 26 o 30 no comprende la secuencia de señalización endógena que está comprendida adicionalmente en la SEQ ID NO: 27 o 31. En otras realizaciones, comprende la secuencia de longitud completa de ScFae1 y ScFae3 proporcionada por los inventores (SEQ ID NO: 27 o 31), que incluye la secuencia señal.

[0025] Preferentemente, estas enzimas tienen actividad feruloil esterasa, en particular, actividad feruloil esterasa de tipo C y D. Más preferentemente, la enzima tiene actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa. Preferentemente, la actividad enzimática es comparable (p. ej., al menos 70 % de actividad, al menos 80 % de actividad o al menos 90 % de actividad) a la actividad sobre al menos un sustrato como se muestra para ScFae1 y ScFae3.

[0026] La secuencia codificante completa de ScFae1, como la proporcionan los inventores, tiene una longitud de 1572 pb, lo que corresponde a una proteína de 523 aminoácidos (aa). Se identificó un péptido señal de 24 aa en el extremo amino de la secuencia de ScFae1.

[0027] La secuencia codificante completa de ScFae3, como la proporcionan los inventores, tiene una longitud de 1569 pb, lo que corresponde a una proteína de 522 aminoácidos (aa). Se identificó un péptido señal de 23 aa en el extremo amino de la secuencia de ScFae3.

[0028] La enzima que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 o 30 puede tener una o más de las características siguientes, preferentemente, todas las características enumeradas en a) a f):

- a) glicosilación;
- b) actividad feruloil esterasa a aproximadamente pH 3-9,5;
- c) pH óptimo de actividad feruloil esterasa a aproximadamente pH 4,5-9,5, lo más preferentemente a aproximadamente pH 5-8,5;
- d) actividad feruloil esterasa sobre los sustratos *p*-cumarato de metilo, ferulato de metilo, cafeato de metilo y sinapato de metilo;
- e) estabilidad térmica hasta aproximadamente 50 °C;
- f) actividad óptima a aproximadamente 30-50 °C, preferentemente aproximadamente 39-43 °C; y/o

que comprende una cola de afinidad adecuada para la purificación, tal como una cola de His, preferentemente, en el extremo carboxilo.

5 **[0029]** La enzima que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 o 30 tiene la actividad máxima para reaccionar con *p*-cumarato de metilo (100 %). La actividad en el ácido clorogénico esterasa es aproximadamente 10 % de la actividad sobre éster metílico de ácido cumárico. Las enzimas son preferentemente FAE de tipo C o D, ya que también pueden reaccionar con sinapato de metilo. Las actividades enzimáticas preferidas de las enzimas que tienen al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 o 30 se presentan en los ejemplos más adelante.

[0030] En algunas realizaciones, la enzima se puede obtener de un basidiomiceto y, si tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con UmChIE, preferentemente del género *Ustilago*, lo más preferentemente de *Ustilago maydis*, o, si tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con RsChIE, se puede obtener preferentemente de un basidiomiceto del género *Rhizoctonia*, más preferentemente *R. solani*. Alternativamente, se puede obtener de un basidiomiceto, preferentemente del género *Schizophyllum*, lo más preferentemente de *Schizophyllum commune*, y tener al menos 85 % de identidad de secuencia con ScFae1 o ScFae3. Los homólogos de otros basidiomicetos pueden ser obtenidos rutinariamente por el experto en la materia, p. ej., usando una sonda de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la invención para cribar un banco de ADNc del basidiomiceto en condiciones de severidad baja, 15 severidad media o severidad alta, aislando así un ácido nucleico homólogo y expresando el mismo en una célula hospedadora adecuada. Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de purificación, tales como una combinación de etapas cromatográficas, p. ej., cromatografía de intercambio aniónico sobre Q Sepharose FF, IEF preparativo, y una combinación de cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de afinidad en poliamida, para purificar enzimas homólogas de otros basidiomicetos. Los procedimientos 20 adecuados se describen pormenorizadamente en los ejemplos.

[0031] En otras realizaciones, la enzima se puede obtener mediante expresión recombinante en una célula hospedadora adecuada, p. ej., en levadura, preferentemente en los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* y *Yarrowia*, más preferentemente en *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* o 30 *Schizosaccharomyces pombe*, y lo más preferentemente en *Pichia pastoris*, p. ej., GS115 de *Pichia pastoris*. La producción satisfactoria de heterólogos de la enzima activa de la invención en *P. pastoris*, como se describe pormenorizadamente más adelante, abre un abanico de oportunidades para diversas aplicaciones y la modificación genética de enzimas. La identificación de los centros catalíticos y la comparación con enzimas conocidas simplifica 35 adicionalmente la modificación genética de enzimas, p. ej., la generación de mutantes que solo tienen actividad ácido clorogénico esterasa o actividad feruloil esterasa, que tienen una especificidad de sustrato modificada, o aún mejor, tolerancia a, p. ej., pH alto o bajo, sales, iones metálicos o temperaturas elevadas. En general, para los mutantes modificados genéticamente que conservan la actividad enzimática de la UmChE, RsChIE, ScFae1 o ScFae3, respectivamente, se deben conservar los centros catalíticos y, preferentemente, los residuos que también entran en contacto con los sustratos, p. ej., residuos adyacentes a los residuos catalíticos, o los residuos que forman la cavidad 40 catalítica.

[0032] La presente descripción también se refiere a un ácido nucleico que codifica la enzima de la invención, es decir, una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o feruloil esterasa que tiene al menos 85 %, preferentemente, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1. 45 En particular, la descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o feruloil esterasa que tiene al menos 85 %, preferentemente, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 que no comprende la SEQ ID NO: 4, o que no codifica una enzima que comprende la SEQ ID NO: 19.

50 **[0033]** Sorprendentemente, los inventores encontraron que era ventajoso usar una secuencia señal heteróloga para la expresión. Por consiguiente, el ácido nucleico de la invención preferentemente no comprende la SEQ ID NO: 4, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia señal natural. El ácido nucleico de la invención puede comprender la secuencia de *U. maydis* de SEQ ID NO: 2 que codifica la enzima de SEQ ID NO: 1 sin el péptido señal, o consistir en la misma, o puede comprender la secuencia de nucleótidos de longitud completa de *U. maydis* SEQ ID 55 NO: 18. Preferentemente, no comprende una secuencia que codifica la proteína hipotética de la genoteca Um00182.1 que tiene la SEQ ID NO: 19.

[0034] El ácido nucleico de la invención también puede codificar una proteína de SEQ ID NO: 1 con una secuencia diferente de SEQ ID NO: 2 como consecuencia de la degeneración del código genético.

60 **[0035]** La presente descripción también se refiere a un ácido nucleico que codifica la enzima adicional de la invención, es decir, una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que tiene al menos 85 %, preferentemente, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22.

65

[0036] Sorprendentemente, los inventores encontraron que era ventajoso usar una secuencia señal heteróloga para la expresión. Por consiguiente, en una opción, el ácido nucleico de la invención no comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia señal natural. El ácido nucleico de la invención puede comprender la secuencia de *R. solani* de SEQ ID NO: 20 que codifica la enzima de SEQ ID NO: 22 sin el péptido señal, o consistir en la misma, o puede comprender la secuencia de nucleótidos de longitud completa de *U. maydis* SEQ ID NO: 21. El ácido nucleico de la invención también puede codificar una proteína de SEQ ID NO: 22 con una secuencia diferente de SEQ ID NO: 20 o la SEQ ID NO: 21 como consecuencia de la degeneración del código genético.

[0037] La presente descripción también se refiere a un ácido nucleico que codifica la enzima adicional de la invención, es decir, una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que tiene al menos 85 %, preferentemente, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 o la SEQ ID NO: 30.

[0038] Sorprendentemente, los inventores encontraron que era ventajoso usar una secuencia señal heteróloga para la expresión. Por consiguiente, en una opción, el ácido nucleico de la invención no comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia señal natural. El ácido nucleico de la invención puede comprender la secuencia de *S. commune* de SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 28 que codifica la enzima de SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 30, respectivamente, sin el péptido señal, o consistir en las mismas, o puede comprender la secuencia de nucleótidos de longitud completa de *U. maydis* SEQ ID NO: 25 o 29. El ácido nucleico de la invención también puede codificar una proteína de SEQ ID NO: 26 o 30 con una secuencia diferente de la SEQ ID NO: 24 o 28 o la SEQ ID NO: 25 o 29 como consecuencia de la degeneración del código genético.

[0039] El ácido nucleico de la invención puede ser un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica la enzima de la invención, que está enlazado funcionalmente a un promotor heterólogo, p. ej., un promotor de alcohol oxidasa (AOX1), promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP), promotor de alcohol deshidrogenasa (ADH), o promotor de galactosa (GAL), preferentemente un promotor de alcohol oxidasa (AOX1). El ácido nucleico que codifica la enzima está preferentemente enlazado funcionalmente a un ácido nucleico que codifica la secuencia señal heteróloga, p. ej., una señal de secreción de factor α tal como la señal de secreción de factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, una señal de secreción de invertasa o una señal de secreción de lisozima.

[0040] El enlace funcional requiere que las secuencias estén, ya que codifican aminoácidos, dentro del marco de lectura y, en general, que estén posicionadas de una manera que les permita realizar sus funciones previstas correspondientes. Por consiguiente, un promotor debe estar posicionado de manera que conduzca a la expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico enlazado funcionalmente, y una secuencia señal debe conducir a la secreción de la proteína enlazada en la célula hospedadora seleccionada. Opcionalmente, la secuencia señal se puede cortar después de la secreción.

[0041] Si el ácido nucleico no está enlazado a una secuencia señal, la proteína expresada se puede purificar a partir de las células hospedadoras, p. ej., después de lisar dichas células. Alternativamente, si la proteína expresada es secretada en el sobrenadante de cultivo, se puede purificar a partir del sobrenadante.

[0042] Se puede incorporar una secuencia de nucleótidos que codifica una cola de afinidad, tal como una cola de hexahistidina, al extremo carboxilo o al extremo amino. Esto permite la purificación fácil de la enzima de la invención, p. ej., a partir de sobrenadante de cultivo, con una columna de afinidad adecuada, p. ej., una Ni-NTA. Alternativamente, se pueden emplear otros procedimientos de purificación, tales como cromatografía de intercambio aniónico sobre Q Sepharose FF, IEF preparativo y/o una combinación interacción hidrofóbica y cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de afinidad en poliamida, o se pueden emplear los cultivos o sobrenadantes de cultivo como tales.

[0043] La descripción también se refiere a una célula hospedadora adecuada, p. ej., como se mencionó anteriormente, que comprende el vector de expresión de la invención. Preferentemente, la célula hospedadora no es *U. maydis*, *S. commune* o *R. solani*, es decir, la célula hospedadora es heteróloga.

[0044] Una característica sorprendente de la enzima de la descripción es su amplia especificidad de sustrato para ésteres de ácido clorogénico y/o ésteres de ácido ferúlico, que se describe pormenorizadamente en los ejemplos más adelante. La actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa se puede determinar como se describe en los ejemplos que se presentan más adelante. En particular, la actividad ácido clorogénico esterasa se determina mediante la capacidad de hidrolizar ácido clorogénico. La actividad feruloil esterasa se determina mediante la capacidad de hidrolizar el grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que normalmente es arabinosa. Una enzima que tiene la actividad enzimática correspondiente puede tener al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 33,3 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 100 % de la actividad correspondiente determinada para cualquiera de las enzimas descritas en los ejemplos que se presentan más adelante. También puede tener actividad superior.

[0045] La descripción también proporciona el uso de una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 1

para hidrolizar un sustrato y/o generar un producto seleccionado del grupo que comprende:

(a) un ácido clorogénico, es decir, un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico seleccionado del grupo que consiste en ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico, preferentemente, ácido cafeico; y/o

5

(b) un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con un ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, donde el ácido fenilpropanoico es preferentemente ácido cafeico, ácido ferúlico o ácido p-cumárico, lo más preferentemente, ácido cafeico.

10 **[0046]** La descripción también proporciona el uso de una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, donde la enzima se selecciona del grupo que comprende una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22, una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 y una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 30, para hidrolizar un sustrato y/o generar un producto seleccionado del grupo que comprende:

15

(a) un ácido clorogénico, es decir, un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico seleccionado del grupo que consiste en ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico, preferentemente, ácido cafeico; y/o

(b) un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con un ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, donde el ácido fenilpropanoico es preferentemente ácido cafeico,

20

ácido ferúlico o ácido p-cumárico, lo más preferentemente, ácido cafeico.

[0047] Preferentemente, la enzima se usa para hidrolizar uno o más de dichos sustratos, pero los inventores encontraron que, en condiciones adecuadas, la enzima también se puede usar para la reacción de síntesis.

25 **[0048]** La descripción proporciona además un procedimiento para hidrolizar un sustrato seleccionado del grupo que comprende:

(a) un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico seleccionado del grupo que consiste en ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico, preferentemente, ácido cafeico; y/o

30

(b) un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con un ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, donde el ácido fenilpropanoico es preferentemente ácido cafeico, ácido ferúlico o ácido p-cumárico, lo más preferentemente, ácido cafeico.

[0049] Dicho procedimiento comprende una etapa donde una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 se pone en contacto con dicho sustrato en condiciones adecuadas, tales como 37 °C, pH 7,5.

35

[0050] La descripción proporciona además un procedimiento para hidrolizar un sustrato seleccionado del grupo que comprende:

40

(a) un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico seleccionado del grupo que consiste en ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico, preferentemente, ácido cafeico; y/o

(b) un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con un ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, donde el ácido fenilpropanoico es preferentemente ácido cafeico, ácido ferúlico o ácido p-cumárico, lo más preferentemente, ácido cafeico.

45

[0051] Dicho procedimiento también comprende una etapa donde una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, donde la enzima se selecciona del grupo que comprende una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22, una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 y una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 30, se pone en contacto con dicho sustrato en condiciones adecuadas, tales como 30 °C, pH 6, para una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22.

50

55 **[0052]** Los procedimientos relativos a los compuestos en (a) son de especial interés en el contexto de la invención.

[0053] El sustrato puede ser un componente de un material natural. Si el sustrato es un componente de un material natural, el éster de (b) normalmente es un éster con un sacárido, tal como un polisacárido, p. ej., di- o trisacárido. El éster puede ser, p. ej., un mono-, di- y trisacárido feruloilado (F-A, F-AX, F-AXG). Los sustratos preferidos adicionales se describen en la parte experimental más adelante.

60

[0054] La presente descripción proporciona además un procedimiento para preparar un producto seleccionado del grupo que comprende:

65

- a) ácido quínico y/o
- b) un ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, preferentemente, ácido cafeico, ácido ferúlico y/o ácido p-cumárico, lo más preferentemente, ácido cafeico y/o
- c) un sacárido tal como un mono- o polisacárido.

5

[0055] Los productos del grupo a), b) y c) son productos de las reacciones de hidrólisis catalizadas por la enzima de la invención. Las condiciones adecuadas pueden ser determinadas por el experto en la materia o se describen en los ejemplos que se presentan más adelante, p. ej., 37 °C, pH 7,5. Como la enzima también puede, en ciertas condiciones, p. ej., descritas en los ejemplos que se presentan más adelante o en la bibliografía citada en esta memoria, sintetizar ésteres, la presente descripción proporciona además un procedimiento para preparar un producto seleccionado del grupo que comprende

10

d) un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico seleccionado del grupo que consiste en ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico, preferentemente, ácido cafeico; y/o

15

e) un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, p. ej., ácido cafeico, ácido ferúlico o ácido p-cumárico, preferentemente, ácido cafeico.

[0056] Dichos procedimientos comprenden una etapa donde una enzima con actividad ácido fenilpropanoico esterasa, preferentemente, actividad clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 se pone en contacto con los eductos de la reacción catalizada, lo que genera el producto correspondiente en condiciones adecuadas.

20

[0057] Alternativamente, dichos procedimientos comprenden una etapa donde una enzima con actividad ácido fenilpropanoico esterasa, preferentemente, actividad clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, donde la enzima se selecciona del grupo que comprende una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22, una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 26 y una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 30, se pone en contacto con los eductos de la reacción catalizada, lo que genera el producto correspondiente en condiciones adecuadas.

25

30

[0058] Dichos procedimientos comprenden opcionalmente una etapa adicional donde el producto se aísla. También se puede formular, p. ej., en una composición para aplicación cosmética o, preferentemente, en una composición farmacéutica para aplicación médica, p. ej., a un paciente humano.

35

[0059] Se purificó hasta homogeneidad y se caracterizó una ácido clorogénico esterasa halotolerante extracelular de *U. maydis*, UmChIE. Se obtuvo una ácido clorogénico esterasa adicional, RsChIE, de *R. solani*, y se obtuvieron enzimas que están principalmente caracterizadas como feruloil esterases, ScFae1 y ScFae3, de *S. commune*. Esto permitió el suministro de las enzimas de la invención. En comparación con las ácido clorogénico hidrolasas descritas anteriormente, dichas enzimas parecen presentar un perfil de sustratos más amplio. Especialmente, la capacidad para liberar no solo ácido cafeico, sino también ácido p-cumárico y ferúlico, de material de desecho agroindustrial, tal como pulpa de café, convierte a estas enzimas en candidatas atractivas para aplicaciones industriales. Los ácidos fenólicos liberados se pueden usar como precursores de aromas naturales o antioxidantes en alimentos y cosméticos.

40

45

[0060] Un estudio reciente en ratones no confirmó algunos de los supuestos efectos beneficiosos del ácido clorogénico dietético; se encontró todo lo contrario a los indicios positivos anteriores (59). En función del resultado de este debate, la enzima de la invención podría proporcionar una herramienta general y eficaz para reducir los riesgos dietéticos implicados en el consumo de concentraciones superiores de ácido clorogénico.

50

[0061] Una enzima de la invención se puede poner en contacto con un material natural, p. ej., alimentos, que puede ser para consumo humano o animal, tal como manzanas, peras y tubérculos de patata, o con material de desecho agroindustrial, tal como pulpa de café, salvado de trigo desalmidonado y remolacha azucarera. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para preparar un material natural tal como un alimento que comprende una cantidad reducida de un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico seleccionado del grupo que consiste en ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico, preferentemente, ácido cafeico. La presente invención también proporciona un procedimiento para reducir los riesgos dietéticos que implica el consumo de ácido clorogénico, en particular, concentraciones altas del mismo, que comprende poner en contacto un producto alimenticio con una enzima con actividad clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 30.

55

60

[0062] La descripción también se refiere a un producto alimenticio, p. ej., un producto para horneado, tal como un producto alimenticio horneado o un producto alimenticio destinado al horneado, que comprende una enzima de la invención, donde dicha enzima puede comprender una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 30.

65

[0063] Sorprendentemente, los inventores encontraron que las enzimas de la descripción, así como otras enzimas que tienen actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, preferentemente al menos actividad ácido clorogénico esterasa, se pueden usar para el reblandecimiento de masas (es decir, la reducción de la resistencia de la masa). La enzima usada para el reblandecimiento de masas es preferentemente una enzima que
5 tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 o una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 22. Lo más preferentemente, es una enzima de la invención como se describió anteriormente, p. ej., UmChIE o RsChIE.

[0064] Los inventores también encontraron otras enzimas que tiene actividad ácido clorogénico esterasa y/o
10 actividad feruloil esterasa, estas enzimas se obtienen preferentemente de un basidiomiceto, tal como *Schizophyllum commune*. ScFae1 y ScFae también se pueden usar para el reblandecimiento de masas. Una enzima que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con ScFAE1 o ScFae3, y que tiene preferentemente una actividad enzimática comparable al ácido clorogénico esterasa y/o feruloil esterasa también se puede usar para el reblandecimiento de masas.

[0065] Por consiguiente, la descripción también proporciona un procedimiento para preparar un producto para
15 horneado, que comprende poner en contacto masa del producto para horneado con una enzima que tiene actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, preferentemente al menos actividad ácido clorogénico esterasa, donde la enzima se selecciona del grupo que comprende una enzima que tiene al menos 85 % de identidad
20 de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 30. Lo más preferentemente, es una enzima de la descripción como se describió anteriormente, p. ej., UmChIE o RsChIE.

[0066] Las enzimas usadas para el reblandecimiento de masas en el contexto de la descripción están
25 caracterizadas, por tanto, por su actividad ácido clorogénico esterasa y/o actividad feruloil esterasa, y se seleccionan del grupo que comprende UmChIE, RsChIE, ScFae1 y ScFae3 y enzimas con al menos 85 % de identidad de secuencia con cualquiera de dichas enzimas y que tienen una actividad enzimática comparable.

[0067] Esta propiedad de reblandecimiento de masas se puede usar ventajosamente en varias aplicaciones de
30 horneado, p. ej., para la reducción de la contracción de la masa. Preferentemente, las enzimas se usan para la preparación de galletas duras y galletitas saladas, donde pueden contribuir a la reducción de la contracción de la masa y de la deformación del producto horneado, para la preparación de masas de *pizza*, donde pueden mejorar las propiedades de moldeo y reducir la contracción de la masa. En la preparación de masa laminada (en láminas), p. ej., para cruasanes o bollería, las enzimas pueden mejorar las propiedades de extensión y laminado.

[0068] Sin desear ceñirnos a la teoría, el efecto tecnológico puede estar basado en la capacidad reducida de
35 la masa para retraer y adoptar la forma antes del moldeo, debido a la tensión reducida de la red de gluten-pentosano.

[0069] Las enzimas se pueden usar en la preparación de masas junto con otras enzimas, p. ej., xilanasas y/o
40 amilasa, o sin otras enzimas.

[0070] Asimismo, la estabilidad significativa al pH de UmChIE en condiciones alcalinas hace que la enzima sea
particularmente adecuada para el tratamiento de pulpa en la industria papelera (pulpa de papel). Se puede usar sola o en combinación con una o más enzimas diferentes, p. ej., una hemicelulasa, una xilanasas, una β -xilosidasa, una α -
45 arabinofuranosidasa o una pectinasa. Los inventores encontraron que la incubación simultánea de UmChIE con xilanasas de *T. viride* (0,025 U) aumentaba la cantidad de ácido ferúlico liberado de DSWB más de doces veces. Este resultado se puede explicar mediante la acción de endoxilanasas que producen xilooligosacáridos de cadena más corta que son sustratos más accesibles para las estererasas.

[0071] En los procedimientos y usos de la descripción se pueden usar todas las enzimas específicas descritas
50 anteriormente, lo que incluye una enzima que tiene la SEQ ID NO: 19.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0072]
55 La **FIG. 1** muestra un análisis mediante SDS-PAGE del ácido clorogénico esterasa purificada (UmChIE) de *U. maydis* y la enzima tratada con endoglicosidasa H. Precision Plus Protein™ Standard (1), UmChIE purificada después de la columna de poliamida (2), UmChIE desglucosilada después del tratamiento con endoglicosilasa H durante 1 h a 37 °C (3), endoglicosidasa H (4).

FIG. 2 ilustra el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de UmChIE. (A) El pH óptimo se determina usando tampón glicina (círculo sólido), tampón acetato (círculo hueco), tampón Bis-Tris (triángulo sólido) y tampón Tris (triángulo invertido hueco); (B) estabilidad al pH; (C) temperatura óptima (círculo sólido) y termoestabilidad (círculo hueco). Para las mediciones de pH y termoestabilidad se determinan las actividades residuales después
60 de preincubar la enzima durante 1 h en los sistemas de tampón anteriores (pH 2-10) y a temperaturas en el intervalo
65

de 20-60 °C, respectivamente. La actividad enzimática restante se determina después de la incubación adicional (1 h, 37 °C) con ferulato de metilo 1 mM. La actividad enzimática relativa [%] se define como el porcentaje de actividad detectada con respecto a la actividad esterasa máxima observada en cada experimento. Los valores son el promedio de experimentos por triplicado, con la desviación estándar mostrada como barras de error.

5 La **FIG. 3** ilustra la alineación de la secuencia de aminoácidos de UmChIE de *Ustilago maydis* (n.º de entrada de GenBank HG970190) con ácido clorogénico esterasa de *Aspergillus niger* CHIE (n.º de entrada de GenBank DQ993161), ácido clorogénico esterasa de *Neurospora crassa* (NcChIE, n.º de entrada de GenBank EAA32507.3) y feruloil esterasa de *Pleurotus eryngii* PeFaeA (n.º de entrada de GenBank CDI44666.1). Los fragmentos peptídicos identificados mediante análisis por IES-EM/EM están subrayados. La tríada catalítica de serina, ácido glutámico/aspártico e histidina está resaltada, mediante cuadros.

15 La **FIG. 4** ilustra el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de RsChIE. (A) El pH óptimo se determina usando tampón glicina (círculo sólido), tampón acetato (círculo hueco), tampón Bis-Tris (triángulo sólido) y tampón Tris (triángulo invertido hueco); (B) temperatura óptima (círculo sólido). Los valores son el promedio de experimentos por triplicado, con la desviación estándar mostrada como barras de error.

EJEMPLOS

20 **Materiales y procedimientos**

Productos químicos y sustratos

25 **[0073]** Todos los productos químicos usados fueron de grado de pureza máximo y fueron adquiridos de Carl Roth (Karlsruhe, Alemania), Merck (Darmstadt, Alemania), Fluka (Buchs, Suiza) o Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania), a menos que se indique de otro modo. El ferulato de metilo y etilo se obtuvieron de Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemania). El cafeato, p-cumarato y sinapato de metilo se sintetizaron según Borneman y col. (23). Los sacáridos feruloilados (5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa (F-A); β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa (F-AX); α -L-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa (F-AXG)) preparados a partir de salvado de maíz desalmidonado fueron amablemente suministrados por M. Bunzel (KIT, Karlsruhe, Alemania). Estos sustratos de esterasas se purificaron e identificaron como se describió (24, 25). La pectina de remolacha azucarera fue de Herbstreith & Fox (Neuenburg, Alemania), el café fue de Tchibo (Hamburg, Alemania) y el salvado de trigo fue de Alnatura (Lorsch, Alemania). Los cebadores para PCR fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania).

35 **Cultivo de *Ustilago maydis* (Uma)**

40 **[0074]** El basidiomiceto *U. maydis* se adquirió de la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania; n.º 17144). La cepa se hizo crecer en líquido de nutrición estándar (SNL)-agar y se mantuvo a 4 °C. El medio SNL fue 30,0 g L⁻¹ de D-(+)-glucosa monohidratada, 4,5 g L⁻¹ de L-asparagina monohidratada, 3,0 g L⁻¹ de extracto de levadura, 1,5 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄, 1,0 mL L⁻¹ de solución de oligoelementos (0,08 g L⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,09 g L⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,03 g L⁻¹ de MnSO₄ x H₂O, 0,005 g L⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,4 g L⁻¹ de EDTA); el pH se ajustó a 6,0 con NaOH 1 M antes de la esterilización en autoclave. Para las placas de SNL-agar, se añadieron 15 g L⁻¹ de agar al SNL.

45 **[0075]** Los cultivos iniciadores se hicieron crecer en 10 % (v/v) de SNL con 5 % (p/v) de salvado de trigo. Los cultivos principales de *U. maydis* se cultivaron en 10 % (v/v) de SNL con 1 % (p/v) de salvado de trigo como inductor para la producción de esterasa (26). Después de trece días de cultivo a 24 °C y 150 rpm en un agitador rotatorio (Infors, Bottmingen, Suiza), los cultivos se recogieron y almacenaron hasta el procesamiento adicional a -20 °C.

50 **Purificación de enzimas**

55 **[0076]** El sobrenadante de cultivo de *U. maydis* se separó de las células congeladas mediante centrifugación (9,600 x g, 30 min, 4 °C), seguida de filtración a presión reducida usando una membrana de polietersulfona (PES) de 0,45 μ m (Merck Millipore, Billerica, EE. UU.). 0,75 L del sobrenadante filtrado se diluyeron una vez con tampón A (Bis-Tris 50 mM pH 6,5) y se aplicaron a una columna de Q Sepharose FF autodepositada de 25 mL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) preequilibrada con tampón A. Se recogieron fracciones de 6,0 mL a un caudal de 4 mL min⁻¹ y se monitorizaron para detectar la actividad esterasa. Las fracciones activas eluidas con 50 % de tampón B (tampón A con NaCl 1 M) se agruparon, concentraron y desalaron usando un módulo de ultrafiltración (corte de 30 kDa, PES, Sartorius, Gottingen, Alemania). Posteriormente, se realizó un electroenfoque isoeléctrico (IEF) con una celda de IEF preparativo Rotofor (Biorad, Hercules, EE. UU.). La muestra concentrada y desalada se mezcló con 2 % de anfolito (pH 2 a 4, Serva, Heidelberg, Alemania). Se añadió dos por ciento de Chaps y prolina a la muestra para reducir la precipitación de proteína durante el ciclo. La solución se enfocó a potencia constante de 12 W durante cuatro horas a 4 °C. Se recogieron las fracciones y se determinó el pH y la actividad esterasa. Las fracciones activas del IEF preparativo se agruparon y lavaron con un módulo de ultrafiltración (corte de 30 kDa, PES, Sartorius, Gottingen,

Alemania), para retirar los aditivos. La purificación final de la enzima se consiguió con una combinación de cromatografía de afinidad e interacción hidrofóbica usando una columna de poliamida autodepositada de 15 mL (MP Biomedicals, Eschwege, Alemania). La muestra activa se diluyó una vez con tampón (acetato 50 mM pH 6,5 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 M) y se cargó en la columna. La UmChIE se eluyó con 65 % de tampón acetato 50 mM pH 6,5.

5

Ensayo de enzimas

[0077] La actividad ácido clorogénico esterasa se determinó a 37 °C en tampón Tris 50 mM a pH 7,5 usando ácido clorogénico y ferulato de metilo como sustratos estándar, a menos que se indique de otro modo. La liberación de los ácidos libres correspondientes se analizó mediante CLAR-UV. En caso necesario, se midió la hidrólisis de otros derivados de éster de ácido benzoico y cinámico, así como de sacáridos feruloilados, con el mismo procedimiento. Después de la incubación durante una hora, se finalizó la reacción doblando el volumen de reacción con acetonitrilo. Las muestras se centrifugaron (15 min, 15,000 x g) antes de la inyección a la CLAR (columna de fase inversa Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt, Alemania). Los sustratos y productos se separaron usando un gradiente escalonado a una velocidad de flujo de 1,5 mL min⁻¹: 10 µL de muestra se cargaron en 90 % de tampón A (0,1 % de ácido fórmico), 10 % de tampón B (acetonitrilo); 10-36 % de tampón B en 8 min; 36-50 % de tampón B en 1,5 min; 55-96 % de tampón B en 0,5 min; 96-99 % de tampón B en 2,5 min; 99-15 % de tampón B en 0,5 min; 15-10 % de tampón B en 1 min; reequilibrar con 10 % de tampón B durante 1 min; tiempo total de ciclo 14 min. La elución de sustancias se detectó a 232 nm (ácido benzoico y 3-hidroxibenzoico), 254 nm (ácido 4-hidroxibenzoico y vanílico), 275 nm (ácido cinámico y gálico), 306 nm (ácido *p*-cumárico) y 323 nm (ácido ferúlico, cafeico, clorogénico y sinápico) usando un detector UV-Vis de Shimadzu (SPD-10A VP, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Alemania). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera un µmol de ácido libre por minuto en las condiciones especificadas. Todas las mediciones se realizaron al menos dos veces.

25 Caracterización bioquímica de UmChIE

i. Determinación de la temperatura y el pH óptimos

[0078] El pH óptimo se determinó midiendo la actividad entera a 37 °C con pH en el intervalo de 2-10 usando los tampones siguientes: soluciones 50 mM de glicina (pH 2-3,5; pH 9-10), acetato (pH 3,5-5,5), Bis-Tris (pH 5,5-7) y Tris (pH 7-9). Para la determinación de la temperatura óptima, se realizó el ensayo de actividad durante 60 min a diversas temperaturas (20 °C-90 °C).

ii. Estabilidad a la temperatura y el pH

35

[0079] Para la determinación de la estabilidad a la temperatura, se incubó la solución de enzima durante 60 min a diferentes temperaturas (20 °C-60 °C). Posteriormente, se añadió el sustrato y tampón Tris 50 mM pH 7,5 y se realizó el ensayo de actividad durante 60 min a 37 °C. La estabilidad al pH se determinó usando los sistemas de tampón descritos anteriormente (30 mM, pH 2-10) con incubación durante 60 min a 37 °C. La actividad enzimática residual se analizó después de la incubación adicional (60 min, 37 °C) en presencia de sustrato y tampón Tris 125 mM pH 7,5.

iii. Efecto de los disolventes, iones metálicos e inhibidores sobre la actividad enzimática

[0080] La tolerancia de las enzimas a diferentes disolventes se investigó en presencia de 50 % (v/v) de acetona, acetonitrilo, dietil éter, DMF, DMSO, etanol, alcohol isoamílico, alcohol isobutílico, isopropanol, metanol, *n*-hexano, *n*-heptano, metil *tert*-butil éter o tolueno, respectivamente, en tampón Tris 50 mM pH 7,5 que contenía sustrato 0,7 mM. En un experimento adicional se usó sustrato 0,84 mM. Después de la incubación (60 min, 37 °C, 900 rpm), la mezcla se aplicó para el análisis mediante CLAR como se describió anteriormente. El efecto de los inhibidores sobre la actividad enzimática se ensayó con los siguientes: bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), EDTA, yodoacetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), SDS y diversos iones metálicos, tales como Cs⁺, K⁺, Li⁺, Sr⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Fe³⁺ y Cr³⁺. Aparte del PMSF (1 mM), todos los demás posibles inhibidores se añadieron en concentraciones de 5 mM. También se investigó el efecto de concentraciones salinas altas (NaCl 0,1-3 M) sobre la actividad enzimática.

55 iv. Especificidad de sustrato y parámetros cinéticos

[0081] La especificidad de sustrato de la UmChIE se determinó frente a diferentes ésteres de cinamato y benzoato, así como frente a sustratos naturales, tales como F-A, F-AX y F-AXG, con ensayos de actividad como se describieron anteriormente. Se prepararon soluciones madre tres mM de todos los sustratos en agua.

60

[0082] Los parámetros cinéticos se determinaron a partir de la velocidad de hidrólisis inicial de ácido clorogénico, ferulato de metilo y *p*-cumarato de metilo 0,005-1 mM (60 min, 37 °C, pH 7,5). Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se calcularon con regresión no lineal usando SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Chicago, EE. UU.). Se llevaron a cabo blancos para todos los ensayos usando agua en lugar de enzima. Para el cálculo de k_{cat} , se determinó la masa molecular usando SDS-PAGE desnaturizante.

65

v. Hidrólisis enzimática de sustratos naturales

[0083] Se preparó salvado de trigo desalmidonado (DSWB) como describieron Johnson y col. (27). El contenido total de ácido ferúlico, p-cumárico y cafeico en DSWB, pectina de remolacha azucarera (SBP) y pulpa de café se determinó después de la hidrólisis alcalina con NaOH 2 M (4 h, 50 °C, 220 rpm). El contenido de ácido fenólico de cada muestra se analizó mediante CLAR después de la acidificación con ácido acético. La concentración de ácido clorogénico en el café se determinó después de la incubación con 80 % de metanol. Las muestras (20 mg) de DSWB y pulpa de café, así como 0,5 % de SBP, se incubaron (37 °C, 20 h, 650 rpm) con UmChIE purificada (0,02 U) en un volumen final de 400 µL que contenía tampón Tris 125 mM pH 7,5. Para investigar la sinergia con otras carbohidrasas, también se analizó la liberación de ácido ferúlico después de la incubación en paralelo de UmChIE con indistintamente xilanasas de *Trichoderma viride* (DSWB, 0,025 U, Fluka, Buchs, Suiza), pectina de tomate esterasa (SBP, Sigma, Taufkirchen, Alemania) o preparaciones de pectinasa (SBP, SternEnzym, Ahrensburg, Alemania). La cantidad de ácidos fenólicos liberados de los sustratos naturales se cuantificó usando CLAR.

SDS-PAGE desnaturalizante

[0084] La pureza y la masa molecular de las enzimas se determinó usando análisis mediante SDS-PAGE (12 % de gel de resolución, 4 % de gel concentrador) según Laemmli (28). Las muestras se prepararon mezclando 1:1 con tampón de muestra (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, DTT 0,2 M, 4 % de SDS, 20 % de glicerol, 0,2 % de azul de bromofenol) e hirviendo durante 10 min. Después de la electroforesis a 15 mA por gel, los geles se tiñeron con InstantBlue (Expedeon, Cambridgeshire, Gran Bretaña).

Huella peptídica

[0085] Las secuencias de aminoácidos de péptidos tripticos de la UmChIE se dedujeron a partir de IES-EM/EM usando un espectrómetro de masas QTOF maXis (Bruker, Bremen, Alemania). El procedimiento se describe pormenorizadamente en otra parte de esta memoria (25). Se realizaron búsquedas en BLAST del NCBI (programa blastp) con las secuencias de aminoácidos obtenidas.

Amplificación de la secuencia de ácido clorogénico esterasa

[0086] El aislamiento de ARN total a partir de micelio de *U. maydis*, que se hizo crecer durante trece días en 10 % (v/v) de SNL enriquecido con 1 % (p/v) de salvado de trigo, así como la síntesis de ADNc, se realizaron como describen Linke y col. (25). La amplificación de la secuencia completa de *CHLE* se consiguió usando los cebadores de la región no traducida (UTR) Uma_fw_UTR (TCCGTTCTTAGAAGCCAAACA (SEQ ID NO: 5)) y Uma_rev_UTR (GAAAGCCAAGCAACAAGGTT (SEQ ID NO: 6)), que se dedujeron en base a la secuencia genética de Um00182.1 disponible (n.º de entrada de GenBank XP_756329.1). Las PCR se realizaron mezclando 10 µL 5x de tampón de ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion, 0,4 µL de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 25 pmol de cebador directo, 25 pmol de cebador inverso, 0,02 U de ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Fermentas, St. Leon-Roth, Alemania), 100 ng de ADNc monocatenario, y ddH₂O hasta 50 µL. La PCR se realizó en un gradiente de MasterCycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) incubando la mezcla de reacción a 98 °C durante 2 min, a continuación durante 35 ciclos a 98 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s. La elongación final se realizó a 72 °C durante 10 min. Todas las etapas adicionales, que incluyen el análisis de los productos de la PCR, la ligación, la transformación en *E. coli* y la PCR de las colonias, se realizaron como se describió anteriormente (29).

Expresión heteróloga en *Pichia pastoris*

[0087] El gen *CHLE*, con y sin la secuencia del péptido señal natural de 21 aminoácidos, se amplificó usando los cebadores UmChIE_Sfw (TTT TTC TCG AGA AAA GAG AGG CTA GGC TGC CTA ATC TG (SEQ ID NO: 7)), UmChIE_Ofw (TTT TTC TCG AGA AAA GAG AGG CTG AAG CTC TTC CAC AAG TCT C (SEQ ID NO: 8)) y UmChIE_rv (TTT TTG CCG CCG CTT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GGA AGC CAA ACA C (SEQ ID NO: 9)) (las bases subrayadas son los sitios de restricción *Xho*I y *Not*I, respectivamente) y se insertó en el sitio *Xho*I-*Not*I del vector de expresión de *P. pastoris* pPIC9 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). La GS115 de *P. pastoris* se transformó con la construcción de expresión linealizada de *Pme*I pPIC9-HIS-*CHLE* para conseguir la inserción del gen *CHLE* en el locus de *AOX1* mediante electroporación (electroporador MicroPulser, Bio-Rad, Múnich, Alemania) (30). Después de la selección de transformantes de *P. pastoris* con capacidad para crecer en placas de agar deficientes en histidina, se cribaron 48 transformantes de cada construcción de expresión para determinar la actividad ácido clorogénico esterasa. Los transformantes se cultivaron en placas de 96 pocillos como describen Sygmund y col. (31). Los sobrenadantes de cultivo se analizaron para determinar la actividad enzimática después de 24, 48, 72, 96 y 120 h con el ensayo descrito anteriormente. Para mantener las condiciones de expresión estable, se añadió diariamente 0,5 % (v/v) de metanol.

Resultados y conclusiones

65 Purificación y propiedades generales de UmChIE

[0088] Cuando se cultivó *U. maydis* en medio SNL, se detectó actividad esterasa, pero los cultivos se volvieron de color negro intenso, lo que impidió la purificación cromatográfica. La composición del medio SNL parecía favorecer la síntesis de melaninas. Se ha descrito la producción de melaninas para *U. maydis* (32, 33). La producción se evitó reduciendo el SNL a 10 % (v/v) y añadiendo 1 % (p/v) de salvado de trigo. Estas condiciones indujeron la producción de esterases con actividades incluso superiores a los cultivos con SNL negros. Después de la optimización del medio de cultivo, la purificación de la ácido clorogénico esterasa UmChIE a partir de sobrenadante de cultivo de *U. maydis* se logró mediante tres etapas de separación complementarias que incluyeron cromatografía de intercambio aniónico sobre Q Sepharose FF, IEF preparativo y, por último, una combinación de cromatografía de afinidad e interacción hidrofóbica en poliamida.

[0089] La masa molecular de la ácido clorogénico esterasa, como se determinó mediante SDS-PAGE desnaturante, fue 71 kDa (Fig.1, carril 2). La masa aparente de la enzima natural estimada mediante cromatografía de exclusión molecular sugirió que la UmChIE era un monómero. Estos resultados demostraron que UmChIE difería de las otras enzimas descritas en la bibliografía. Mientras que Asther y col. (13) y Adachi y col. (15) identificaron el ácido clorogénico hidrolasas naturales como homodímeros de aproximadamente 2 x 80 kDa, Benoit y col. (14) sugirió que la enzima de *A. niger* recombinante existe como una forma tetramérica. Schobel y Pollmann (12) caracterizaron la segunda ácido clorogénico esterasa conocida de *A. niger* también como un tetrámero (4 x 60 kDa), mientras que Okamura y Watanabe (16) describieron la éster de ácido hidroxicinámico hidrolasa de *A. japonicus* como un monómero de 145 kDa. El IEF preparativo, usado como segunda etapa de purificación, produjo un pi de aproximadamente 3,0 para la UmChIE.

Caracterización del ácido clorogénico esterasa purificada

[0090] Hasta la fecha, solo están bien caracterizadas un cuanto ácido clorogénico hidrolasas (EC 3.1.1.42) (11-15), mientras que se han purificado y caracterizado numerosas feruloil esterases (FAE; EC 3.1.1.73), una subclase del éster carboxílico hidrolasas, a partir de una amplia gama de bacterias y hongos.(7-10). Algunas feruloil esterases presentaron la capacidad de hidrolizar ácido clorogénico, tales como FAEB de *A. niger* (34) y una feruloil esterasa de tipo B de *Neurospora crassa* (35). Como UmChIE aceptaba el ácido clorogénico como el sustrato más preferido, pero también hidrolizaba sustratos de las feruloil esterases eficazmente, la enzima se comparó tanto con ácido clorogénico esterases como con feruloil esterases en términos de sus propiedades.

[0091] Como se muestra en la Fig. 2, la influencia del pH sobre la actividad esterasa y la estabilidad se investigó en el intervalo de pH de 2-10. La actividad máxima para la hidrólisis de ferulato de metilo se observó a pH 7,5, y se detectó más de 50 % de actividad residual en el intervalo de pH de 5,5-9,5 (Fig. 2A). Después de una hora de incubación a 37 °C, la enzima fue más estable en condiciones de neutras a alcalinas que en condiciones ácidas (Fig. 2B). UmChIE retuvo más de 80 % de su actividad máxima entre pH 4,5-10. Los pH óptimos determinados de los dos ácidos clorogénicos hidrolasas de *A. niger* publicadas (11, 13) y de las FAE de tipo B enumeradas por Koseki y col. (36) se encontraron entre pH 6 y 7. Especialmente, la estabilidad al pH de UmChIE fue diferente del ácido clorogénico hidrolasas de *A. niger* caracterizadas, que fueron más estables en condiciones ácidas que en condiciones alcalinas. La ácido clorogénico esterasa aislada por Schobel y Pollmann (12) fue estable en un intervalo de pH de 3-8,5 después de 10 min de incubación a una temperatura indefinida. Por tanto, UmChIE tiene una estabilidad al pH significativa en condiciones alcalinas, lo que hace que la enzima resulte una candidata atractiva para aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, para el tratamiento de pulpa en la industria papelera (37).

[0092] La temperatura de reacción óptima de la UmChIE se registró a 37 °C (Fig. 2C). La actividad enzimática comenzó a reducirse rápidamente a 45 °C para volverse prácticamente inactiva a 60 °C. Después de la preincubación a pH 7,5 y 37 °C durante una hora, la enzima perdió 28 % de su actividad. La termoestabilidad de UmChIE se redujo rápidamente por encima de 40 °C. La temperatura óptima determinada fue inferior a las descritas para el ácido clorogénico esterases y la mayoría de las feruloil esterases (36). Asimismo, la enzima purificada fue menos termoestable que las descritas anteriormente (12-14).

[0093] La aplicabilidad de la UmChIE para la síntesis de ésteres se examinó en emulsiones 1:1 (v/v) de tampón con diferentes disolventes (véase la Tabla 1). Las actividades enzimáticas relativas se calcularon en base a una muestra incubada en tampón sin disolvente orgánico (37 °C; una hora, pH 7,5, 900 rpm). Algunos de los disolventes ensayados son inmiscibles en agua, pero se garantizó un área interfásica grande entre la fase orgánica y la polar agitando energicamente la mezcla de reacción. UmChIE presentó buena estabilidad en *n*-hexano y *n*-heptano, con actividades relativas de 87 % y 84 %. Se detectó actividad de moderada a ligera en alcohol isoamílico (64 %) y alcohol isobutílico (23 %). En todos los demás sistemas, la actividad enzimática residual fue inferior a 7 %. La buena estabilidad de la UmChIE en *n*-hexano y *n*-heptano indicó el potencial de la enzima para la actividad sintética inversa. De hecho, Topakas y col. demostraron la síntesis de ésteres de ácido fenólico con una feruloil esterasa de *Fusarium oxysporum* (38) y *Sporotrichum thermophile* (39) usando una microemulsión exenta de tensioactivo formada en una mezcla de agua-disolvente orgánico que consistía en *n*-hexano, 1-propanol/1-butanol y agua como sistema de reacción.

65

Tabla 1 Efecto de los disolventes orgánicos sobre la actividad de UmChIE.

Disolvente orgánico	Actividad esterasa relativa [%]	
<i>n</i> -hexano	87	(2,12)
<i>n</i> -heptano	84	(0,89)
Alcohol isoamílico	64	(2,43)
Alcohol isobutílico	23	(6,53)
Tolueno	7	(1,67)
Isopropanol	6	(0,37)
Metanol	5	(0,23)
Acetona	3	(2,59)
Acetonitrilo	3	(3,18)
DMF	1	(0,76)
Dietil éter	ND	
DMSO	ND	
Etanol	ND	
Metil <i>terc</i> -butil éter	ND	

Actividades residuales de UmChIE para la hidrólisis de ferulato de metilo 0,7 mM (1 h, 37 °C, 900 rpm) en un sistema binario compuesto por tampón Tris pH 7,5 y disolventes orgánicos en la relación 1:1 (v/v). La actividad esterasa determinada sin disolvente orgánico se estableció en 100 %. Los números entre paréntesis son las estimaciones del error estándar. ND: actividad no detectable.

Estudios de inhibición

[0094] Se examinaron diversos iones metálicos e inhibidores enzimáticos para determinar su efecto sobre la actividad ácido clorogénico esterasa (Tabla 2). La actividad enzimática residual se midió usando el ensayo de actividad estándar en presencia de iones metálicos/inhibidores 5 mM (excepto PMSF, 1 mM). La adición de Hg²⁺ dio como resultado la pérdida completa de actividad enzimática. Hg²⁺ reacciona con los grupos tiol y también puede reducir los enlaces disulfuro (40). Entre los iones metálicos ensayados, se detectó una inhibición significativa de la actividad de UmChIE, a actividades residuales de 50-76 %, en presencia de Al³⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Fe³⁺ y Zn²⁺, mientras que Mn²⁺ redujo ligeramente la actividad enzimática a 90 %. Por consiguiente, la enzima de la invención se puede usar en presencia de todos los iones metálicos ensayados excepto Hg²⁺ con una actividad residual significativa. La inhibición de la actividad de UmChIE por Zn²⁺, Hg²⁺ y Al³⁺ fue coherente con las propiedades de una feruloil esterasa de *Russula virescens* (41). Esta feruloil esterasa también fue inhibida por Fe²⁺, mientras que UmChIE no lo fue, sino que solo fue inhibida por Fe³⁺. El efecto negativo de Fe³⁺ sobre la actividad esterasa también fue demostrado por Donaghy y McKay (42) y Yao y col. (43). Algunas esterasas también fueron inhibidas por Cu²⁺ (42, 43) y Cd²⁺ (41).

Tabla 2 Efecto de los iones metálicos, los inhibidores y el NaCl sobre la actividad de UmChIE.

Concentración [mM]	Sustancia	Actividad esterasa relativa [%]	
5	KCl	108	(0,57)
5	NiSO ₄	108	(0,87)
5	MgCl ₂	106	(0,53)
5	LiCl	106	(1,39)
5	CsCl	105	(1,21)
5	SrNO ₃	104	(0,18)
5	CaCl ₂	103	(2,76)
5	FeSO ₄	102	(0,50)
5	Cu(NO ₃) ₂	96	(0,53)
5	MnSO ₄	90	(0,09)
5	ZnSO ₄	76	(1,26)
5	Cr(NO ₃) ₃	69	(3,54)
5	CoCl ₂	67	(0,11)
5	FeCl ₃	66	(0,65)
5	Al ₂ (SO ₄) ₃	53	(0,12)

(continuación)

Concentración [mM]	Sustancia	Actividad esterasa relativa [%]	
5	HgAc ₂	ND	
5	EDTA	105	(1,14)
5	CTAB	104	(0,70)
5	Yodoacetamida	102	(0,81)
5	SDS	59	(0,83)
1	PMSF	36	(2,01)
100	NaCl	105	(0,02)
500	NaCl	121	(0,01)
1000	NaCl	125	(0,02)
2000	NaCl	142	(0,06)
3000	NaCl	150	(0,04)

La actividad enzimática restante se midió después de 1 h de incubación con ferulato de metilo 1 mM o, en un experimento adicional, 1,95 mM, y diferentes iones metálicos, así como inhibidores, en las concentraciones enumeradas anteriormente (a 37 °C, tampón Tris 50 mM pH 7,5). Los números entre paréntesis son las estimaciones del error estándar. Se usó una muestra sin aditivo para el cálculo de las actividades enzimáticas relativas.

ND: actividad no detectable.

[0095] La actividad enzimática fue inhibida 41 % por SDS y 64 % por PMSF, mientras que la incubación con CTAB, EDTA y yodoacetamida no presentó ningún efecto (Tabla 2). La pérdida de actividad prácticamente completa en presencia de PMSF, un inhibidor de esterasas conocido, sugirió que la tríada catalítica de UmChIE contenía un residuo de serina (44). Por el contrario, la actividad enzimática no se vio afectada por CTAB, que reacciona con el triptófano y los grupos SH de la cisteína, lo que indicaba que estos residuos de aminoácido no estaban implicados en la catálisis enzimática (45).

10 [0096] Asimismo, se investigó la tolerancia de UmChIE frente a diversas concentraciones de NaCl (0,1-3 M). Se demostró que la actividad enzimática aumentaba con la concentración salina hasta 150 % en presencia de NaCl 3 M (Tabla 2). Un efecto simulador del efecto del NaCl sobre la actividad esterasa fue descrito anteriormente por Nieter y col. (29) y Kumar y col. (46).

15 Especificidad hidrolítica y propiedades cinéticas de UmChIE

[0097] Se examinó un conjunto integral de sustratos para determinar la hidrólisis por UmChIE. Los sustratos incluyeron ésteres de ácido cinámico y benzoico, así como sustratos naturales, tales como F-A, F-AX, F-AXG y ácido clorogénico (Tabla 3). Se encontró que el ácido clorogénico era el más eficazmente hidrolizado. La actividad específica determinada de 2,8 U mg⁻¹ para el ácido clorogénico se estableció en 100 % y se usó para el cálculo de las actividades relativas para todos los demás sustratos. UmChIE hidrolizó p-cumarato de metilo (MpCA, 52 %), ferulato de metilo (MFA, 46 %) y cafeato de metilo (MCA, 18 %), pero no sinapato de metilo (MSA). Estos cuatro sustratos sintéticos típicos de las feruloil esterasas se usaban habitualmente para clasificar las FAE. Crepin y col. (10) dividieron las FAE en cuatro tipos (A-D) en base a su especificidad de sustrato, homología de secuencia y análisis bioquímico. La ausencia de hidrólisis de MSA daría como resultado FAE de tipo B según Crepin y col. (10). Mientras tanto, el sistema de clasificación fue ampliado mediante análisis filogenético de FAE fúngicas por Benoit y col. (47), mientras que un análisis computacional basado en descriptores con modelado de farmacóforos (48) ofreció un intento alternativo de clasificación.

Tabla 3 Especificidad de sustrato de UmChIE purificada.

Sustancia	Actividad esterasa relativa [%]		Actividad esterasa específica [U mg ⁻¹]
ácido clorogénico	100		2,76
F-A	75	(0,16)	2,06
F-AX	59	(0,36)	1,63
p-cumarato de metilo	52	(0,06)	1,43
ferulato de metilo	46	(0,16)	1,27
F-AXG	33	(0,09)	0,92
ferulato de etilo	28	(0,45)	0,78

(continuación)

Sustancia	Actividad esterasa relativa [%]	Actividad esterasa específica [U mg ⁻¹]
cafeato de metilo	18 (0,03)	0,49
benzoato de metilo	ND	ND
benzoato de etilo	ND	ND
3-hidroxibenzoato de metilo	ND	ND
4-hidroxibenzoato de metilo	ND	ND
4-hidroxibenzoato de etilo	ND	ND
4-hidroxibenzoato de propilo	ND	ND
4-hidroxibenzoato de butilo	ND	ND
cinamato de metilo	ND	ND
cinamato de etilo	ND	ND
galato de metilo	ND	ND
sinapato de metilo	ND	ND
vanilato de metilo	ND	ND
vanilato de etilo	ND	ND

La UmChIE purificada se incubó con 1 mM o, en un experimento diferente, 1,95 mM de diferentes sustratos durante 1 h (a 37 °C, tampón Tris 50 mM pH 7,5). Las actividades enzimáticas relativas se calcularon en base a la sustancia más preferida de la UmChIE: ácido clorogénico, que se estableció en 100 %. Los números entre paréntesis son las estimaciones del error estándar. Abreviaturas: F-A: 5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa, F-AX: β-o-xilopiranosil-(1→2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa, F-AXG: α-L-galactopiranosil-(1→2)-β-D-xilopiranosil-(1→2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa y ND: actividad no detectable.

[0098] UmChIE también fue capaz de liberar ácido ferúlico del ferulato de etilo, pero aproximadamente 50 % menos que de MFA. Por consiguiente, la elongación de la cadena de alquilo con enlaces éster dio como resultado la reducción de la actividad enzimática (49). Mientras que la presencia de un grupo metoxi en la posición *meta* del anillo benzoico redujo la actividad enzimática marginalmente (MpCA 52 % frente a MFA 46 %), un segundo grupo metoxi provocó la pérdida total de actividad (MSA). Asimismo, UmChIE no hidrolizó ningún sustrato sin grupo hidroxilo o metoxi en el anillo benzoico (cinamato de metilo/etilo). El hecho de que UmChIE no presentara actividad hidrolítica contra ningún derivado de benzoato indica la necesidad de una cierta distancia entre el anillo aromático y el enlace éster. Este requisito para la actividad catalítica de las feruloil esterases también fue descrito por Topakas y col. (50) y Kroon y col. (51).

[0099] UmChIE también hidrolizó sustratos naturales pequeños tales como mono-, di- y trisacáridos feruloilados (F-A, FAX, F-AXG). F-A fue el hidrolizado más eficazmente (2,0 U mg⁻¹), seguido de FAX (1,6 U mg⁻¹) y F-AXG (0,9 U mg⁻¹). Asimismo, la FAEA de *A. niger* (34) prefirió los sustratos naturales de FAE en el mismo orden, mientras que PeFaeA de *Pleurotus eryngii* (29) y Est1 de *Pleurotus sapidus* (25) prefirieron el sustrato natural F-A menos que F-AX. Por el contrario, la FAE de *Penicillium expansum* presentó actividades específicas superiores para el ferulato de metilo (14,4 U mg⁻¹) que para F-AX (5,3 U mg⁻¹) (42).

[0100] Las propiedades cinéticas se determinaron a partir de las velocidades de hidrólisis iniciales para los sustratos más preferidos ácido clorogénico, MFA y MpCA. La UmChIE purificada poseía las constantes cinéticas siguientes (K_m ; k_{cat} ; k_{cat}/K_m): MFA (101,8 mM; 0,38 s⁻¹; 3,75 mM⁻¹s⁻¹), MpCA (64,1 μM; 0,49 s⁻¹; 7,63 mM⁻¹s⁻¹) y ácido clorogénico (19,6 mM; 0,51 s⁻¹; 25,83 mM⁻¹s⁻¹). La determinación de los valores de K_m demostró que la enzima tenía una afinidad de tres a cinco veces superior por el ácido clorogénico que por MpCA y MFA. Asimismo, los valores de k_{cat}/K_m revelaron que la UmChIE hidrolizaba el ácido clorogénico de tres a siete veces más eficazmente que MpCA y MFA. Por consiguiente, la eficacia catalítica (k_{cat}/K_m), un buen indicador de la eficacia y especificidad enzimática, fue mejor para el ácido clorogénico que para los dos sustratos sintéticos.

[0101] Mientras que la UmChIE se podría seguir clasificando como una feruloil esterasa en base a su perfil de sustratos, las constantes cinéticas demostraron claramente la afiliación a la familia del ácido clorogénico esterases. Aquí, los valores de K_m descritos anteriormente para el ácido clorogénico como sustrato fueron 6,5-10 mM (13, 14) y 0,7 mM (11) para las segundas ácido clorogénico hidrolasas de *A. niger* publicadas. Hay alguna otra bibliografía disponible que trata de una actividad enzimática sobre el ácido clorogénico. Por el contrario, los valores de K_m se determinaron para tres feruloil esterases de tipo B para el sustrato ácido clorogénico como se indica a continuación: 245 mM para FAEB de *A. niger* (34), 180 mM para feruloil esterasa de tipo B de *N. crassa* (35) y 630 mM para AoFaeB de *A. oryzae* (19). Las feruloil esterases mencionadas anteriormente no solo presentaron una afinidad más de diez veces inferior por el ácido clorogénico que UmChIE, sino que poseían una K_m tres veces inferior para MpCA (20 mM)

que para UmChIE (64 mM). También presentaron especificidad superior por MCA que por MFA.

[0102] Por último, la UmChIE se distinguió claramente de las otras dos enzimas publicadas por su amplio perfil de sustratos. El ácido clorogénico hidrolasas identificadas anteriormente únicamente eran activas sobre ácido clorogénico. Asther y col. (13) ensayaron la actividad del ácido clorogénico hidrolasa natural para el éster metílico de hidroxicinamatos, mientras que Benoit y col. (14) investigaron FA y F-AX como sustratos para la enzima recombinante, pero ninguno de estos sustratos fue hidrolizado.

Liberación de ácidos fenólicos de sustratos naturales

10

[0103] Para la determinación de la especificidad de UmChIE, se usaron SBP y DSWB como sustratos debido al enlace diferente del ácido ferúlico a los residuos de arabinosa (3). Se seleccionó el subproducto agroindustrial pulpa de café debido a su alto contenido de ácido clorogénico. Las cantidades totales de ácido cafeico, ácido ferúlico y *p*-cumárico se cuantificaron mediante CLAR después de la hidrólisis alcalina para pulpa de café (1,65 mg g⁻¹, 0,53 mg g⁻¹, 0,07 mg g⁻¹), DSWB (-; 4,45 mg g⁻¹; 0,18 mg g⁻¹) y SBP (-; 6,78 mg g⁻¹; -;). Además, la pulpa de café contenía 2,66 mg g⁻¹ de ácido clorogénico en total.

[0104] Después de la incubación de pulpa de café con UmChIE (0,02 U; 20 h, 37 °C y 650 min⁻¹ en un termoagitador), se hidrolizó 68 % de la cantidad inicial de ácido clorogénico. Por el contrario, la ácido clorogénico hidrolasa nativa, así como la recombinante, de *A. niger* liberaron después de la incubación durante la noche 100 % del contenido inicial de ácido clorogénico de la pulpa de café, pero las enzimas se usaron con concentraciones de dos a seis veces superiores que UmChIE (13, 14). UmChIE también liberó cantidades significativas de ácidos fenólicos de la pulpa de café. Por tanto, se liberó 18 %, 15 % y 26 % de la concentración de ácido cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, respectivamente, extraíble en álcalis. El contenido de ácido cafeico extraíble en álcalis superior a la cantidad total de ácido clorogénico se puede explicar por la existencia de conjugados de ácido cafeico distintos del ácido clorogénico, tales como ácido dicafeoilquinico o ésteres de ácido feruloil-cafeoilquinico (4).

[0105] UmChIE (0.02 U) liberó cantidades pequeñas de ácido ferúlico del DSWB. La incubación simultánea con xilanasas de *T. viride* (0.025 U) aumentó la cantidad de ácido ferúlico liberado del DSWB más de doce veces, mientras que la incubación con xilanasas de *T. viride* no liberó nada de ácido ferúlico. Por el contrario, la UmChIE fue menos activa sobre SBP, incluso en presencia de diferentes preparaciones de pectinasa, se liberó 3 veces menos del ácido ferúlico extraíble en álcalis de SBP que de DSWB. La interacción sinérgica observada de UmChIE tanto con xilanasas como con pectinasas se puede explicar por la acción de las carbohidrasas que producen oligosacáridos feruloilados de cadena más corta, que son sustratos más accesibles para la enzima. Una acción sinérgica de las xilanasas y feruloil esterases se describió anteriormente (26, 52-54).

Amplificación y caracterización genética de la secuencia de UmChIE

[0106] Se obtuvieron siete péptidos trípticos de la ácido clorogénico esterasa purificada mediante IES-EM/EM: ADATASAPTVK (P1, SEQ ID NO: 10), FAKPQPLGPASSHK (P2, SEQ ID NO: 11), HPTVEQSFKR (P3, SEQ ID NO: 12), LANGVGCT- GGSLLR (P4, SEQ ID NO: 13), VWSYEFQQNDK (P5, SEQ ID NO: 14), EAMDALNTR (P6, SEQ ID NO: 15) y AKPPVGSLR (P7, SEQ ID NO: 16). La búsqueda de homologías con Blastp (BLAST del NCBI) los identificó (P1-P7) como parte de la proteína hipotética Um00182.1 de *U. maydis* 521 (n.º de entrada de GenBank **XP_756329.1**). Después del aislamiento de ARN de cultivos de *U. maydis* que se hicieron crecer trece días en 10 % (v/v) de medio SNL enriquecido con 1 % (p/v) de salvado de trigo, se sintetizó el ADNc y se amplificó satisfactoriamente la secuencia de UmChIE (n.º de entrada de GenBank **HG970190**) usando cebadores de la UTR. La secuencia codificante completa de UmChIE tiene una longitud de 1758 pb, lo que corresponde a una proteína de 585 aminoácidos (aa). La secuencia de ácidos nucleicos completa de UmChIE (SEQ ID NO: 18) poseía tres diferencias a nivel de nucleótidos que condujeron a un cambio a nivel de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) en la posición 492 (prolina a leucina) en comparación con la secuencia de Um00182.1 (SEQ ID NO: 19).

Expresión heteróloga de UmChIE en *P. pastoris*

[0107] Para confirmar que la secuencia comentada (n.º de entrada de GenBank **HG970190**) codifica la ácido clorogénico esterasa UmChIE de *U. maydis* caracterizada, se clonó la secuencia putativa dentro del marco de lectura con la secuencia señal se secreción de factor α de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control transcripcional del promotor de alcohol oxidasa (*AOX1*) y se integró en GS115 de *P. pastoris*. Se generaron construcciones de expresión con y sin la secuencia señal natural. Se incorporó una cola de hexahistidina en el extremo carboxilo. Únicamente los transformantes que llevaban la construcción de expresión sin la secuencia señal natural presentaron actividad ácido clorogénico esterasa. Después de la inducción con 0,5 % (v/v) de metanol, estos transformantes de *P. pastoris* expresaron satisfactoriamente el gen recombinante y secretaron la enzima activa al medio de cultivo. Después de la inducción con metanol durante 96 h, la actividad ácido clorogénico esterasa del medio de cultivo (0,8 U L⁻¹) fue ocho veces superior a los cultivos de control de GS115 de *P. pastoris*.

65 Ejemplo 2: ácido clorogénico esterasa de *Rhizoctonia solani* (RsChIE)

- [0108]** Se amplificó una secuencia que codifica un ácido clorogénico esterasa de *Rhizoctonia solani*, RsChIE, a partir de *Rhizoctonia solani* y se expresó en *Pichia pastoris*. La secuencia codificante se clonó en el vector de expresión, p. ej., pPIC9, sin la secuencia señal natural (SEQ ID NO: 20). Se añadió una cola de afinidad, p. ej., una cola de His en el extremo carboxilo, a la secuencia codificante como una opción para la purificación. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de RsChIE son las siguientes:

ATGGGCTGCGATCGACCTCGACAAGcTCTTCAfTCCCTCAAGAGTTCACGGTCATGTTCTCT
AAGTGGCTACCTATCTCGGCGaTTTTaCTATATgGTGCTTCCGCAAAGCAcTGGACTGTGCG
 GGgTTATTCAAGAAATCGCAGACgCTTATCAAAGGGATTaATCCATtTGTGCTGaGgTCCACCC
 aGCAAATGTAACcTTTGTTCGGTGGGGAACATAGCTTACCCTGACCCGGTACCCGACCTaCC
 GGAGTTTTGCCGTTTCGGTGCAGaATACAACACATCaTAAATCCAAGTTTAGATTtGAAGTAT
 GGCTACCAACGTCAAAAAAGTGGAAACGGTcGTTTTGCATTcATTGGCAACGGTGGGGATGCT
 GGCGGTGTGAATTATGCTGATATGGCCATTCCATTGGCGAAATATGGGTTTGTGGTCGCGAG
 CACCAACACCGGTCACGATGGAACCCAcGGtGACGGAACATTTGcGATTTCTAATCCCGAGTC
 ACAGATTGATTTCCGGGCaCCGAGCTGTACATCTCAGTACCGTGTTCGCAAAGACAATCGCAA
 ATCATACTATGGAAAGCCATCTACGTATAAtAcTGGATTGGATGCTCTAGCGGAGGAAAACAA
 GGACTgAAATCGGCCCAAGCATATCCCGCGGACTTTGATGGGGTTATCGCAGGTGCACCGGC
 TCAATGGTGGCCTCATCTTAATGGCTTCACTACCCATGTGAATATGTTGAAtGCCAAAGCTACC
 ACTCCGGGGGCGACGATTCCtAcTcATTTTTTACGGCGTTGAATCAGGAGGTAGTTGCCCAA
 TGTGGaAAGCTGGATGGAGTCGAcGATGGGATTATCACAAACCCTAGGTTGTGCAAGCCCGAT
 CTTACTCGTGTTCATGCGGATCAACCAATGCCTCTCCATATGTCAATTCAAGTAATTGTTTAT
 CGAAActTCAGCTCGTAACGCTCAAAGCTAtTACACCAACTGGACATCGAGCAATGGAGAGTT
 CCTGTTCCCTACCTTCGAGCCCGGAAGCGAATTTGGGTGGCCAAATAcGTCaATGGGGTTC
 CATATGGACCTGGACCCGACTACTTCTTATATCAGGTATAACAAGACATCCGTTcAGAAGT
 TGCAAATCAATGAGGCCGAGCTTCAAAGACTGGTcGCAATAGCGGATGTAACCAACCCTGGT
 CAAAGCAGAGCTATCGACCCCAACTTGAATCCATTCTTCAAACGTGGTGGAAAACtGTTGCAG
 TATCATGGGTTcGcAGATCCTCTTATCCCGTCTGGGAGCTCCCTGTGGTACTACGAACACGTT
 CGGAGTTACTTCAAGAACGCAGAcTTAAGCGAtCGATAACGTTTGTTCATGATCCCAGGTGTTG
 CTCATTGCTCtGGAGGGCCAGGTGCAGATGCGTTCCGGACGACCcGGCCAACGTAGCGTTTCC
 CTAGGCGGCGCAGGCCAATCCCTATCATTACTCCGCAGTACGACATGATCCTTGCTACTATC
 AACTGGGTAGAGAAGGGAGTGGCCCCGAAGTCACTCATTGGGACGAAGTACAAAAATAACAA
 TATTAGAGAAGGCGCAAATTCACCCGGCTATTCTGTCCCTTACCcGCAAGAAGCAATCTACCG
 CGGCGGGAACGTGAATGTAGCTAGCAGTTATTCTGTGCGGTGTCCGCGCTTGA (SEQ ID
 NO: 21)

MGCDRPRQALHSLQEFTVMFSKWLPIsAILLYGASAKALDCAGLFKKSQTLIKGINPFVAEVHPA
NVTFVPVGNIAYPDPVPLPEFCRFGAEYNTSSKSKFRFEVWLPTSKKWNRFaFIGNGGDAGG
VNYADMAIPLAKYGFVVAStNTGHDGTHGDGTFaISNPESQIDFGHRAVHLSTVFAKTIKSYYGK
PSTYNYWIGCSSGGKQGLKSAQAYPADFDGVIAGAPAQWWPHLNGFTTHVNMLNAKATTPGATI
PTSFFtALNQEVAQCGKLDGVDGIItnPRLCKPDLTRVACGStNASPYVNSSNCLSKLQLVTLK
AIYTNWtSSNGEFLFPTFEPGSEFGWPNTVNGVVPYGPDPYFLYQVYNKTSVQKLQINEAELQRL
VAIADVTNPGQSRAIDPNLNPFfKRGGKLLQYHGfADPLIPSGSSLWYYEHVRSYfKNADLSDRY
RLFMIPGVAHCSGGPGADAFGRPGQRSVSLGGAGQSLSFTPQYDMILATINWVEKGVAPKSLIGT
KYKNNNIREGAKFTRLFCYPQEAiYRGGNVNVASSYSCGVRA (SEQ ID NO: 23)

- 10 **[0109]** La secuencia señal natural se presenta en cursiva, negrita y subrayada. Las secuencias sin las secuencias señal se designan SEQ ID NO: 22 (aminoácidos) y SEQ ID NO: 20 (ácidos nucleicos).

- [0110]** Después de la purificación de la RsChIE recombinante a partir del sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris* con Ni-NTA, se caracterizó bioquímicamente la enzima. Los experimentos se realizaron como para UmChIE.
 15 Se analizaron el pH y la temperatura óptimos. La actividad esterasa máxima se consiguió a pH 6,0 (Fig. 4A) y a 30 °C (Fig. 4b).

Tabla 4 especificidad de sustrato de RsChIE purificada.

Sustancia	Actividad esterasa relativa [%] (ES)	Actividad específica [U/mg]
cumarato de metilo	100 (0,11)	6,19
ácido clorogénico	83 (0,12)	5,15
F-AX	80 (0,05)	4,97
cafeato de metilo	74 (0,13)	4,61
F-A	72 (0,13)	4,48
F-AXG	59 (0,08)	3,66
ferulato de etilo	58 (0,07)	3,60
ferulato de metilo	51 (0,02)	3,19
cinamato de metilo	34 (0,09)	2,10
cinamato de etilo	15 (0,05)	0,91
sinapato de metilo	-	

La RsChIE purificada se incubó con 1 mM o, en un experimento diferente, 1,95 mM de diferentes sustratos durante 1 h (a 30 °C, tampón Bis-Tris 50 mM pH 6,0). Las actividades enzimáticas relativas se calcularon en base a la sustancia más preferida de la RsChIE: p-cumarato de metilo, que se estableció en 100 %. Los números entre paréntesis son las estimaciones del error estándar.

Abreviaturas: F-A: 5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa, F-AX: β-D-xilopiranosil-(1→2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa, F-AXG: α-L-galactopiranosil-(1→2)-β-D-xilopiranosil-(1→2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa y ND: actividad no detectable.

[0111] La actividad más alta de RsChIE se detectó para el cumarato de metilo, seguido de los sustratos naturales ácido clorogénico y F-AX. Asimismo, la ausencia de hidrólisis de sinapato de metilo demuestra que RsChIE, al igual que UmChIE, también tiene actividad feruloil esterasa de tipo B. Asimismo, al igual que UmChIE, tampoco presenta actividad sobre derivados del ácido benzoico.

[0112] A continuación, se determinaron las constantes cinéticas para decidir si la enzima tiene principalmente actividad ácido clorogénico esterasa o feruloil esterasa.

Tabla 5: análisis cinético de RsChIE

	K_m [μ M]	$v_{m\acute{a}x}$ [U/mg]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$mM \times s^{-1}$]
cafeato de metilo	28,5	16	20,00	70,18
cumarato de metilo	35,8	26,5	33,13	925,28
ácido clorogénico	18,3	23,4	29,25	1598,36
F-AX	38,4	23,3	29,13	758,46

[0113] En base a los valores de K_m y a la eficacia catalítica, (k_{cat}/K_m), se podría demostrar que la nueva esterasa de *Rhizoctonia solani* es principalmente una ácido clorogénico esterasa (por comparación (K_m de UmChIE = 19,6 μ M).

Ejemplo 3

[0114] Se amplificaron ScFae1 y ScFae3 a partir de *S. commune*. Las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes se presentan como SEQ ID NO: 24 y 28 (sin secuencia señal) y SEQ ID NO: 25 y 29 (con secuencia señal endógena). Las secuencias de aminoácidos correspondientes se presentan como SEQ ID NO: 26 y 30 (sin secuencia señal) y SEQ ID NO: 27 y 31 (con secuencia señal endógena).

[0115] Las enzimas se caracterizaron en lo que respecta a la actividad a diferentes temperaturas: las enzimas se incubaron con ferulato de metilo durante 30 min a 20-90 °C, tampón Tris 50 mM pH 7,5 (n = 3). La reacción se finalizó con 50 % de acetonitrilo y se analizó la liberación de ácido ferúlico del sustrato usando CLAR-UV. Se determinó una temperatura óptima de aproximadamente 39-45 °C.

[0116] Las enzimas se caracterizaron en lo que respecta a la actividad a diferentes pH: las enzimas se incubaron con ferulato de metilo durante 30 min a 37 °C, pH 2-10 (n = 3). Se usaron los sistemas de tampón siguientes: 50 mM de glicina (2,0-3,5; 9,0-10,0), acetato (3,5-5,5), Bis-Tris (5,5-7,0) o Tris (7,0-9,0). La reacción se finalizó con 50 % de acetonitrilo y se analizó la liberación de ácido ferúlico del sustrato usando CLAR-UV. Se determinó una 5 estabilidad al pH alta a pH 3-9,5 y una estabilidad óptima amplia a aproximadamente pH 5-8,5.

[0117] En SDS-PAGE, para ambas ScFAE, hubo una banda proteica principal en las muestras con una masa molecular de aproximadamente 100 kDa. La banda proteica que se eliminó después de la purificación parcial de las enzimas nativas solo presentaba una masa molecular de 65 kDa. Para determinar si la diferencia de masa molecular 10 era consecuencia de la hiperglicosilación de las enzimas recombinantes o si la única banda proteica en el gel una proteína hospedadora, las muestras purificadas se trataron con Endo H para retirar la N-glicosilación, que es una modificación postraduccional típica realizada por la *Pichia*. Después del tratamiento con endo H, en el gel de SDS-PAGE, ambas enzimas presentaban una masa molecular inferior. Mientras que la ScFae3 desglucosilada 60993 tenía una masa molecular de aproximadamente 85 kDa, la ScFae1 poseía una masa molecular de aproximadamente 15 70 kDa. Las bandas proteicas marcadas se eliminaron para verificar la producción de ambas enzimas recombinantes. La secuenciación verificó estas bandas proteicas como las enzimas correspondientes.

Tabla 6

	Actividad FEA relativa de ScFae1 [%]	Actividad FEA relativa de ScoFae3 [%]
Galato de metilo	4,36	5,13
Cinamato de metilo	8,76	8,71
Cinamato de etilo	4,31	3,60
Cafeato de metilo	49,56	47,25
Ácido clorogénico	14,15	11,50
Ferulato de metilo	72,16	64,58
Ferulato de etilo	69,88	62,31
F-A	86,16	83,99
F-AX	96,87	105,70
F-AXG	92,93	83,32
Sinapato de metilo	3,12	2,89
Benzoato de metilo	1,98	2,32
Benzoato de etilo	1,26	1,32
Benzoato de 3-OH-metilo	6,68	6,65
Benzoato de 4-OH-metilo	26,69	+31,42
Benzoato de 4-OH-etilo	23,02	21,27
Benzoato de 4-OH-propilo	20,58	23,05
Benzoato de 4-OH-butilo	22,15	20,52
Salicilato de metilo	0,00	0,00
Vanilato de metilo	11,14	10,40
Vanilato de etilo	10,30	10,18
Cumarato de metilo	100,00	100,00

Las enzimas purificadas se incubaron con 1 mM de diferentes sustratos durante 30 min a 37 °C en tampón Tris 50 mM pH 7,5. Las actividades enzimáticas relativas se calcularon en base a la sustancia más preferida de la enzima: p-cumarato de metilo, que se estableció en 100 %. Abreviaturas: F-A: 5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa, F-AX: β-D-xilopiranosil-(1→2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa, F-AXG: α-L-galactopiranosil-(1→2)-β-D-xilopiranosil-(1→2)-5-O-*trans*-feruloil-L-arabinofuranosa.

[0118] Se examinó un conjunto integral se sustratos para determinar la actividad hidrolítica de las ScFAE recombinantes purificadas. Los sustratos incluyeron diferentes ésteres de ácido cinámico y benzoico, así como sustratos naturales, tales como F-A, F-AX, F-AXG y ácido clorogénico. Ambas enzimas poseían un perfil de sustratos muy comparable, aunque las secuencias de ambas enzimas tienen solo 90 % de homología a nivel de aminoácidos.

5 Se encontró que el cumarato de metilo era el más eficazmente hidrolizado, seguido directamente por los sacáridos feruloilados. Las actividades determinadas para el cumarato de metilo se establecieron en 100 % y se usaron para el cálculo de las actividades relativas para todos los demás sustratos. Esta enzima es la primera enzima analizada con actividad feruloil esterasa y/o ácido clorogénico esterasa que hidroliza un sustrato sintético el más eficazmente. Las nuevas ScFAE poseen un perfil de sustratos exclusivo. Asimismo, la hidrólisis de p-cumarato de metilo, ferulato de metilo y cafeato de metilo verificó estas nuevas enzimas como FAE de tipo C o D según el sistema de clasificación de FAE fúngicas. La diferencia entre las FAE de tipo C y D es la capacidad para liberar ácido diferúlico de sustratos naturales, la cual no fue investigada. Adicionalmente, el perfil de sustratos demostró que el alargamiento de la cadena de alquilo con enlaces éster no afectaba a la actividad hidrolítica significativamente. Por lo que las actividades esterasa relativas determinadas para el éster metílico, etílico, propílico y butílico de los sustratos correspondientes difieren solo
10 ligeramente. Estas son las primeras FAE de basidiomicetos analizadas que fueron ligeramente activas sobre derivados de benzoato.
15

Ejemplo 4

20 Aplicación de las ácido clorogénico esterases y/o feruloil esterases en productos para horneado

A Uso de UmChIE en procedimientos de horneado

[0119] La enzima UmChIE purificada se usó ejemplarmente para la demostración del impacto de las enzimas en los productos para horneado. Más precisamente, se produjeron panecillos y barras de pan en un estudio de horneado.
25

[0120] Para los estudios de horneado, las masa básicas se prepararon como se indica a continuación: 1000 g de harina de trigo (T 550), 1,5 % de levadura, 1,8 % de NaCl, 2 % de azúcar, 2 % de Biskin (grasa de palma), 40 ppm de ácido ascórbico y 600 mL de agua. El efecto de UmChIE (1 U) sobre el volumen del pan se estudió en combinación con una xilanasa (25 ppm) y amilasa (15 ppm). La masa tratada solo con amilasa o con xilanasa y amilasa sirvió como referencia. La masa se amasó con una amasadora Diosna SP 12 con convertidor de frecuencia a 25 Hz (2 min) y 50 Hz (6 min). Después de 10 min de la primera prueba, la masa se dividió en piezas de 50 g. Después de la prueba adicional durante 30 min a temperatura ambiente, las piezas de masa se colocaron en una cámara de fermentación a
30 32 °C durante 40/60 min. Por último, las piezas de masa se hornearon a 230 °C durante 18 min.
35

[0121] El volumen de los productos de horneado fríos se monitorizó según el principio de represión. Los resultados para los panecillos (masa de 50 g) se compararon y se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 7: Volumen de horneado de los panecillos (50 g), calculado en volumen específico (ml/100 g):

	amilasa	amilasa, xilanasa	amilasa, xilanasa, UmChIE 1 U
fermentación normal	664,7	732,7	718
fermentación excesiva	685,8	725,1	710,2

40 **[0122]** Sorprendentemente, la presencia de la enzima UmChIE da como resultado una reducción del volumen específico durante un estudio de horneado. Este fenómeno se puede explicar por el reblandecimiento de la masa. Estos resultados demuestran que la ácido clorogénico esterasa/feruloil esterasa UmChIE se puede usar para el reblandecimiento de la masa.
45

B Propiedades reológicas de masa tratada con ácido clorogénico esterasa y/o feruloil esterasa

[0123] Con este experimento, se investigaron el ácido clorogénico esterases y/o feruloil esterases producidas recombinantemente de *Ustilago maydis* UmChIE, *Rhizoctonia solani* RsChIE y *Schizophyllum commune* ScFae1 y ScFae3 para determinar su impacto sobre el reblandecimiento de la masa. El reblandecimiento de la masa se demostró mediante ensayo con el equipo de extensibilidad de masa de Kieffer (Kieffer y col., 1998) usando un equipo SMS/Kieffer y un analizador de texturas TA TX2 (Stable Micro Systems Ltd., Reino Unido). Las masas tratadas con enzima se prepararon según el protocolo siguiente:
50

- 55 1. Se ajustan 42 g de harina a 60 % de capacidad de absorción de agua
2. Añadir 25 ml de agua corriente que contiene 3,4 % de cloruro de sodio
3. Añadir preparación de ácido clorogénico esterasa (1 U/ml)
4. Amasar durante 1 min usando una amasadora de horquilla de laboratorio Y1-ETK

5. Pesar 50 g de masa y redondear durante 30 s, así como laminar durante 30 s, usando una estación de redondeo y laminado
 6. Colocar la masa en desecador a 90 % de humedad y dejar reposar durante 3 min
 7. Preparar el equipo Kieffer según el manual del sistema Descartar las hebras 1-4 y 14-17
 5 8. Colocar el equipo durante tres minutos en desecadores (90 % de humedad) y comenzar las mediciones
 9. Monitorizar al menos nueve mediciones con el fin de minimizar los errores de medición

[0124] Las dosificaciones de enzima se eligieron empíricamente con 0,1, 1 y 10 unidades. La evaluación de los datos se realizó usando las medidas promediadas en comparación con medidas de referencia. Se usó una masa no
 10 tratada como referencia.

Tabla 8: ensayo con el equipo Kieffer para UmChIE

		UmChIE			
dosificación	[U]	0	0,1	1	10
fuerza máx.	[g]	51,0	51,5	44,6	41,4
recorrido	[mm]	-23,4	-22,7	-21,8	-25
fuerza máx. rel.	[%]		0,8	-12,6	-19,0
recorrido rel.	[%]		-2,8	-6,8	6,9

Tabla 9: ensayo con el equipo Kieffer para ScFae de transformantes de *P. pastoris* seleccionados

		ScFae1				ScFae3		
dosificación	[U]	0	0,1	1	10	0,1	1	10
fuerza máx.	[g]	51,0	52,1	52,5	45,4	59,2	48,1	46,5
recorrido	[mm]	-23,4	-23,9	-22,1	-24,2	-24,2	-22,4	-23,2
fuerza máx. rel.	[%]		2,1	2,9	-11,1	15,9	-5,8	-8,9
recorrido rel.	[%]		-2,1	2,1	-5,5	-3,2	-4,5	-0,7

Tabla 10: equipo de Kieffer para RsChIE de diferentes muestras

		RsChIE (muestra 1)			RsChIE (muestra 2)			
dosificación	[U]	0	0,1	1	4	0,1	1	4
fuerza máx.	[g]	51,0	-	45,4	29,2	-	41,9	26,3
recorrido	[mm]	-23,4	-	-23,3	-25,7	-	-24,6	-23,5
fuerza máx. rel.	[%]		-	-11,0	-42,7	-	-17,8	-48,5
recorrido rel.	[%]		-	-0,3	9,8	-	-5,3	-0,4

- 15 **[0125]** La fuerza máxima relativa es una medida del reblandecimiento de la masa. Se describe mediante las diferencias entre el valor de referencia y el valor medido. Los resultados demuestran que todas las ácido clorogénico esterases y/o feruloil esterases conducen al reblandecimiento de la masa. El efecto fue dependiente de la concentración de enzima usada. El uso de enzimas que tienen actividad ácido clorogénico esterasa y/o feruloil esterasa para el reblandecimiento de la masa se demuestra por primera vez en la presente invención.

20

REFERENCIAS

[0126]

- 25 1. Ishii T. 1997. Structure and function of feruloylated polysaccharides. Plant Sci. 127:111-127.
 2. Cosgrove DJ. 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. Plant physiology 125:131-134.
 3. Ralet MC, Faulds CB, Williamson G, Thibault JF. 1994. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. Carbohydrate research 263:257-269.
 30 4. Clifford MN. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and

- metabolism. *J Sci Food Agric* 79:362-372.
5. Kroon PA, Garcia-Conesa MT, Fillingham IJ, Hazlewood GP, Williamson G. 1999. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J Sci Food Agric* 79:428-434.
6. Williamson G, Faulds CB, Kroon PA. 1998. Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. *Biochemical Society transactions* 26:205-209.
7. Wong DW. 2006. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Applied biochemistry and biotechnology* 133:87-112.
8. Fazary AE, Ju YH. 2007. Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 39:811-828.
9. Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P. 2007. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem.* 42:497-509.
10. Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. 2004. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:647-652.
11. Schobel B, Pollmann W. 1980. Further characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences* 35:699-701.
12. Schobel B, Pollmann W. 1980. Isolation and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Biosciences* 35:209-212.
13. Asther M, Estrada Alvarado MI, Haon M, Navarro D, Asther M, Lesage-Meessen L, Record E. 2005. Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of biotechnology* 115:47-56.
14. Benoit I, Asther M, Bourne Y, Navarro D, Canaan S, Lesage-Meessen L, Herweijer M, Coutinho PM, Asther M, Record E. 2007. Gene overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology* 73:5624-5632.
15. Adachi O, Ano Y, Akakabe Y, Shinagawa E, Matsushita K. 2008. Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:143-151.
16. Okamura S, Watanabe M. 1982. Purification and properties of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from *Aspergillus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* 46:1839-1848.
17. Barbe C, Dubourdieu D. 1998. Characterization and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. *J Sci Food Agric* 78:471-478.
18. Levasseur A, Benoit I, Asther M, Record E. 2004. Homologous expression of the feruloyl esterase B gene from *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein expression and purification* 37:126-133.
19. Koseki T, Hori A, Seki S, Murayama T, Shiono Y. 2009. Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83:689-696.
20. Vafiadi C, Topakas E, Christakopoulos P, Faulds CB. 2006. The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC. *Journal of biotechnology* 125:210-221.
21. Qi M, Wang P, Selinger LB, Yanke LJ, Forster RJ, McAllister TA. 2011. Isolation and characterization of a ferulic acid esterase (Fae1A) from the rumen fungus *Anaeromyces mucronatus*. *Journal of applied microbiology* 110:1341-1350.
22. Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G, Faulds CB. 2001. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of applied microbiology* 90:873-881.
23. Borneman WS, Hartley RD, Morrison WH, Akin DE, Ljungdahl LG. 1990. Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33:345-351.
24. Allerdings E, Ralph J, Steinhart H, Bunzel M. 2006. Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry (Elsevier)* 67:1276-1286.
25. Linke D, Matthes R, Nimtz M, Zorn H, Bunzel M, Berger RG. 2013. An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:7241-7251.
26. Garcia-Conesa MT, Crepin VF, Goldson AJ, Williamson G, Cummings NJ, Connerton IF, Faulds CB, Kroon PA. 2004. The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: production of three discrete feruloyl esterases, including a novel enzyme, TsFaeC, with a broad substrate specificity. *Journal of biotechnology* 108:227-241.
27. Johnson KG, Harrison BA, Schneider H, MacKenzie CR, Fontana JD. 1988. Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp. *Enzyme Microb. Technol.* 10.
28. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
29. Nieter A, Haase-Aschoff P, Linke D, Nimtz M, Berger RG. 2014. A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. *Fungal biology* 118:348-357.
30. Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Luong LT, Vu J, Johnson SD, Lin-Cereghino GP. 2005. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques* 38:44, 46, 48.
31. Sygmond C, Gutmann A, Krondorfer I, Kujawa M, Glieder A, Pscheidt B, Haltrich D, Peterbauer C, Kittl R. 2012. Simple and efficient expression of *Agaricus meleagris* pyranose dehydrogenase in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94:695-704.
32. Nicolaus RA, Piattelli M. 1965. Progress in the chemistry of natural black pigments. *Accademia delle Scienze Fische e Matematiche in Napoli. Rendiconto (Series 4)* 32:83 - 97.

33. Wheeler MH. 1983. Comparison of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans. Br. mycol. Soc.* 81:29-36.
34. Benoit I, Navarro D, Marnet N, Rakotomanomana N, Lesage-Meessen L, Sigoillot JC, Asther M, Asther M. 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate research* 341:1820-1827.
- 5 35. Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. 2003. A non-modular type B feruloyl esterase from *Neurospora crassa* exhibits concentration-dependent substrate inhibition. *The Biochemical journal* 370:417-427.
36. Koseki T, Fushinobu S, Ardiansyah, Shirakawa H, Komai M. 2009. Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84:803-810.
- 10 37. Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Perez-Boada M, Martinez MJ, Sigoillot JC, Colom JF, Martinez AT. 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of biotechnology* 115:333-343.
38. Topakas E, Stamatis H, Biely P, Kekos D, Macris BJ, Christakopoulos P. 2003. Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *Journal of biotechnology* 102:33-44.
- 15 39. Topakas E, Stamatis H, Biely P, Christakopoulos P. 2004. Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:686-690.
40. Vallee BL, Ulmer DD. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu Rev Biochem.* 41:91-128.
- 20 41. Wang L, Zhang R, Ma Z, Wang H, Ng T. 2014. A feruloyl esterase (FAE) characterized by relatively high thermostability from the edible mushroom *Russula virescens*. *Applied biochemistry and biotechnology* 172:993-1003.
42. Donaghy J, McKay AM. 1997. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*. *Journal of applied microbiology* 83:718-726.
- 25 43. Yao J, Chen QL, Shen AX, Cao W, Liu YH. 2013. A novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library with tannase activity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 95:55-61.
44. Gold AM, Fahrney D. 1964. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. II. Formation and reactions of phenylmethanesulfonyl alpha chymotrypsin. *Biochemistry* 3:783-791.
45. Anson ML. 1940. The reactions of iodine and iodoacetamide with native egg albumin. *The Journal of general physiology* 23:321-331.
- 30 46. Kumar L, Singh B, Adhikari DK, Mukherjee J, Ghosh D. 2012. A thermoalkaliphilic halotolerant esterase from *Rhodococcus* sp. LKE-028 (MTCC 5562): Enzyme purification and characterization. *Process Biochem.* 47:983-991.
47. Benoit I, Danchin EGJ, Bleichrodt R-J, de Vries RP. 2008. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology Letters* 30:387-396.
- 35 48. Udatha DB, Kouskoumvekaki I, Olsson L, Panagiotou G. 2011. The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. *Biotechnology advances* 29:94-110.
49. de Vries RP, vanKuyk PA, Kester HC, Visser J. 2002. The *Aspergillus niger* faeB gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *The Biochemical journal* 363:377-386.
- 40 50. Topakas E, Christakopoulos P, Faulds CB. 2005. Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: characterization of their substrate specificity for methyl phenylalkanoates. *Journal of biotechnology* 115:355-366.
51. Kroon PA, Faulds CB, Brezillon C, Williamson G. 1997. Methyl phenylalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases. *European journal of biochemistry / FEBS* 248:245-251.
- 45 52. Faulds CB, Sancho AI, Bartolome B. 2002. Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:489-494.
53. Moukouli M, Topakas E, Christakopoulos P. 2008. Cloning, characterization and functional expression of an alkalitolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:245-254.
- 50 54. Faulds CB, Williamson G. 1995. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:1082-1087.
55. Benoit I, Asther M, Sulzenbacher G, Record E, Marmuse L, Parsiegla G, Gimbert I, Asther M, Bignon C. 2006. Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS letters* 580:5815-5821.
56. Brenner S. 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334:528-530.
57. Dodson G, Wlodawer A. 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends in biochemical sciences* 23:347-352.
58. Shin HD, Chen RR. 2007. A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad pH applicability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73:1323-1330.
59. Mubarak A, Hodgson JM, Considine MJ, Croft KD, Matthews VB. 2013. Supplementation of a high-fat diet with chlorogenic acid is associated with insulin resistance and hepatic lipid accumulation in mice. *Journal of agricultural and food chemistry* 61:4371-4378.
- 60 60. GenBank accession no. **XP_756329.1**
61. Kieffer, R, Wieser, H, Henderson, MH, & Graveland, A. 1998. Correlations of the Breadmaking Performance of Wheat Flour with Rheological Measurements on a Micro-scale. *Journal of Cereal Science*, 27(1), 53-60.
- 65 62. MacKenzie and Bilous, 1988, *Appl Environ Microbiol* 54:1170-1173.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0127]

- 5
<110> SternEnzym GmbH&Co. KG

<120> Una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa
- 10 <130> STR15531PCT

<160> 31

<170> BiSSAP 1.3
- 15
<210> 1
<211> 564
<212> PRT
<213> Ustilago maydis
- 20
<400> 1

ES 2 813 684 T3

Leu Pro Gln Val Ser Tyr Lys Ala Asp Ala Thr Ala Ser Ala Pro Thr
 1 5 10 15
 Val Lys Leu His Gln Gly Thr Val Arg Gly Leu Ala Asp Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Glu Gln Phe Phe Gly Ile Pro Tyr Ala Lys Pro Pro Val Gly
 35 40 45
 Ser Leu Arg Phe Ala Lys Pro Gln Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser His
 50 55 60
 Lys Thr Val Ile Asp Ala Thr Arg Phe Gly Asp Ile Cys Met Gln Thr
 65 70 75 80
 Val Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Asn Met Ser Glu Asp Cys Leu Asn Leu
 85 90 95
 Asn Val Val Arg Pro Lys Gly Thr Thr Ala Lys Asp Lys Leu Pro Val
 100 105 110
 Leu Val Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Arg Gln Gly Ser Thr Pro Ile
 115 120 125
 Tyr Asn Ala Ser Glu Leu Val Gln Lys Ser Val Glu Ile Gly Lys Pro
 130 135 140
 Ile Val Phe Val Ala Ile Ser Tyr Arg Val Gly Pro Phe Gly Phe Ile
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Glu Ile Ala Asp Ser Asp Ser Ala Thr Ser Asn Ala Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Asp Gln Arg Leu Gly Leu Lys Trp Ile Arg His Asn Ile Gly
 180 185 190
 Lys Phe Gly Gly Asp Lys Asn Arg Val Thr Leu Phe Gly Gln Ser Ala
 195 200 205
 Gly Ala Met Ser Ile Ala Leu Gln Asn Phe Ala Tyr Asp Gly Asn Asn
 210 215 220
 His Gly Leu Trp His Ala Ala Ile Met Asn Ser Gly Gly Ile Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Pro Leu Leu Thr Pro Lys His Pro Thr Val Glu Gln Ser Phe Lys
 245 250 255
 Arg Leu Ala Asn Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly Ser Leu Leu Arg Cys
 260 265 270
 Leu Arg Lys Ala Asn Ala Ser Glu Val Gln Thr Val Ala Ser Asn Leu
 275 280 285
 Thr Ala Gln Ala Gly Gly Thr Phe Pro Ile Pro Gly Ala Leu Ala Trp
 290 295 300
 Leu Pro Leu Val Asp Tyr Glu Leu Ile Thr Asn Tyr Pro Ser Val Asn
 305 310 315 320
 Leu Pro Gln Gly Lys Leu Ala Asp Ile Pro Val Ile Gln Gly Asn Ala
 325 330 335
 Leu Asp Glu Gly Thr Ser Phe Ala Gln Lys Gln Leu Asn Ser Ser Ala
 340 345 350

ES 2 813 684 T3

Asp Phe Glu Arg Trp Val Arg Ser Ala Ala Val Ile His Asn Thr Ser
 355 360 365
 Tyr Thr Glu Gln Ala Leu Gln Lys Val Phe Glu Leu Tyr Pro Asp Val
 370 375 380
 Pro Glu Gln Gly Ser Pro Phe Tyr Asn Ala Glu Thr Ala Thr Ser Ala
 385 390 395 400
 Ala Thr Thr Ser Asp Leu Asn Ser Arg Gln Tyr Pro Pro Leu Thr Ser
 405 410 415
 Asn Gln Tyr Lys Arg Ser Ala Ala Phe Phe Gly Asp Phe Thr Phe Gln
 420 425 430
 Ala Gln Arg Arg Thr Tyr Leu Lys Ala Ala Thr Leu Gly Trp Lys Lys
 435 440 445
 Asn Lys Ala Lys Val Trp Ser Tyr Glu Phe Gln Gln Asn Asp Lys Phe
 450 455 460
 Ala Asn Gly Thr Gly Ser Leu Leu Gly Pro Tyr His Gly Ala Asp Val
 465 470 475 480
 Lys Tyr Tyr Phe Ile Arg Pro Asp Gly Arg Gln Lys Asp Pro Val Leu
 485 490 495
 Ala Asp Arg Met Pro Arg Ala Tyr Ile Ser Phe Val Tyr His His Asp
 500 505 510
 Pro Thr Val Leu Gly Gly Phe Glu Trp Pro Pro Tyr Gly Lys Gly Lys
 515 520 525
 Lys Leu Leu Gln Met Lys Gly Asp Asn Thr Thr Val Ile Glu Asp Ala
 530 535 540
 Tyr Arg Lys Glu Ala Met Asp Ala Leu Thr Asn Arg Lys Ala Ala Lys
 545 550 555 560
 Val Phe Gly Phe

<210> 2

<211> 1695

5 <212> **ADN**

<213> Ustilago maydis

<400> 2

ES 2 813 684 T3

cttccacaag tctcttaca agctgacgcc accgcctctg ctcccacagt caaactccac 60
 caaggtactg tgcgcggctt ggccgacgac aattatggcc tggacaatt ctttggcatt 120
 ccctatgcc agccaccctg cggtcgcgc cgatttgcca agccacagcc tctcggccca 180
 gcctcgtccc acaaaacggt catcgacgct actcgattcg gcgacatctg tatgcagact 240
 gttgcaccct cgcctctcta taacatgagc gaagactgtc tcaatctcaa tgtcgttcgt 300
 cccaaaggaa caacggccaa ggacaagctt ccggtgctgg tttggatcta tgggtggggcg 360
 ttcaggcaag gctcaacgcc catttacaac gccagcgaat tgggtgcagaa gagcgtcgag 420
 attggcaagc cgattgtatt tgttgcgatc agctatcgag tgggtccatt cggcttcac 480
 ggtggatccg agattgctga cagtgactcg gctaccagca acgcagggct gtatgatcag 540
 agattgggac tcaagtggat tcgccacaac attggcaagt ttggaggtga caagaacagg 600
 gtcactctgt tcggtcagag tgcgggcgcg atgagcattg ctctgcagaa ctttgcctat 660
 gatggttaaca accacgggct ttggcatgcc gcgatcatga actcgggcgg aattgctccg 720
 ggtccactgt taacgccc aaacacctacg gtggaacaga gcttcaagag gctggccaat 780
 ggcgttggat gtacaggagg atcactgctc cggtgtctgc gtaaagcaaa cgcgagtgag 840

 gttcagaccg tggccagtaa tctgactgct caagccggcg gaacatttcc cattcctgga 900
 gcgcttgctg ggttgccact ggtcgactac gagctcatca ccaactatcc cagtgtcaac 960
 cttccgcaag gtaaactggc cgacatcccg gtgatccaag gaaacgctct ggacgaagga 1020
 acatcttttg ccagaaaca gctcaacagc agcggcatt tcgaacggtg ggtcagaagc 1080
 gctgctgtca tccacaacac ttcgtacacc gagcaagcgc ttcaaaaggc ctttgaactc 1140
 taccagatg ttcctgaaca gggctcgcca ttctacaatg cggagacggc cacttctgct 1200
 gctaccacgt cggacctcaa ttcgcgccag tatccacctt tgaccagcaa tcagtacaag 1260
 cgttcagcgg cgttctttgg cgacttcaact ttccaggcgc agcgacgaac ttatctcaag 1320
 gcggcaacct tgggctggaa gaagaacaag gccaaagtat ggtcctacga gttccagcag 1380
 aacgacaagt ttgctaagt tactggatcg ctgttgggcc cataccatgg tgctgatgtc 1440
 aagtactatt ttattcgacc tgatggaagg cagaaggacc ccgtcttggc cgatagaatg 1500
 cctagggcgt atatcagttt cgtgtatcac catgatcca cggtgctcgg tggtttcgaa 1560
 tggccgcctt acggaaaagg caagaagctg ctgcagatga aaggtgacaa cacgacgtg 1620
 atcgaggatg cctataggaa ggaggcgatg gatgcgctga ccaacaggaa agctgccaag 1680
 gtgtttggct tctaa 1695

<210> 3
 <211> 21

ES 2 813 684 T3

<212> PRT
 <213> Ustilago maydis

<220>

5 <223> Secuencia señal

<400> 3

Met	Arg	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Trp	Ala	Ala	Thr	Ser	Val
1				5					10					15	
Gly	Leu	Val	Ser	Ala											
			20												

10

<210> 4
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Ustilago maydis

15

<400> 4

atgaggctgc	ctaactctgac	actgctcgta	tgggcagcca	catccgctcg	cttggtgtcg	60
gct						63

20

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador
 <400> 5

30

tccgttcta gaagccaac a 21

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cebador

40

<400> 6
 gaaagccaag caacaaggtt 20

45

<210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Cebador
 <400> 7

ttttctoga gaaaagagag gctaggctgc ctaactcg 38

55

<210> 8
 <211> 43

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 8

ttttctcga gaaaagagag gctgaagctc tccacaagt ctc 43

10

<210> 9
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Cebador

<400> 9

20

ttttgcggc cgcttaatga tgatgatgat gatggaagcc aaacac 46

<210> 10

<211> 11

25

<212> PRT
<213> Ustilago maydis

<220>

<223> Péptido tríptico obtenido mediante IES-EM/EM

30

<400> 10

Ala Asp Ala Thr Ala Ser Ala Pro Thr Val Lys

1

5

10

35

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Ustilago maydis

40

<220>
<223> Péptido tríptico obtenido mediante IES-EM/EM

<400> 11

Phe Ala Lys Pro Gln Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser His Lys

1

5

10

45

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
50 <213> Ustilago maydis

<220>

<223> Péptido tríptico obtenido mediante IES-EM/EM

55

<400> 12

His Pro Thr Val Glu Gin Ser Phe Lys Arg 15 10

ES 2 813 684 T3

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Ustilago maydis

5

<220>
 <223> Péptido tríptico obtenido mediante IES-EM/EM

<400> 13

10

Leu Ala Asn Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly Ser Leu Leu Arg
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Ustilago maydis

15

<220>
 <223> Péptido tríptico obtenido mediante IES-EM/EM

20

<400> 14

Val Trp Ser Tyr Glu Phe Gln Gln Asn Asp Lys
 1 5 10

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ustilago maydis

30

<220>
 <223> Péptido tríptico obtenido mediante IES-EM/EM

<400> 15

Glu Ala Met Asp Ala Leu Thr Asn Arg
 1 5

35

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ustilago maydis

40

<220>
 <223> Péptido tríptico obtenido mediante IES-EM/EM

<400> 16

Ala Lys Pro Pro Val Gly Ser Leu Arg
 1 5

<210> 17
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Ustilago maydis

50

<220>
 <223> Longitud completa incl. secuencia señal natural y P492L

55

<400> 17

ES 2 813 684 T3

Met Arg Leu Pro Asn Leu Thr Leu Leu Val Trp Ala Ala Thr Ser Val
1 5 10 15
Gly Leu Val Ser Ala Leu Pro Gln Val Ser Tyr Lys Ala Asp Ala Thr
20 25 30
Ala Ser Ala Pro Thr Val Lys Leu His Gln Gly Thr Val Arg Gly Leu
35 40 45
Ala Asp Asp Asn Tyr Gly Leu Glu Gln Phe Phe Gly Ile Pro Tyr Ala
50 55 60
Lys Pro Pro Val Gly Ser Leu Arg Phe Ala Lys Pro Gln Pro Leu Gly
65 70 75 80
Pro Ala Ser Ser His Lys Thr Val Ile Asp Ala Thr Arg Phe Gly Asp
85 90 95
Ile Cys Met Gln Thr Val Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Asn Met Ser Glu
100 105 110
Asp Cys Leu Asn Leu Asn Val Val Arg Pro Lys Gly Thr Thr Ala Lys
115 120 125
Asp Lys Leu Pro Val Leu Val Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Arg Gln
130 135 140
Gly Ser Thr Pro Ile Tyr Asn Ala Ser Glu Leu Val Gln Lys Ser Val
145 150 155 160
Glu Ile Gly Lys Pro Ile Val Phe Val Ala Ile Ser Tyr Arg Val Gly
165 170 175
Pro Phe Gly Phe Ile Gly Gly Ser Glu Ile Ala Asp Ser Asp Ser Ala
180 185 190
Thr Ser Asn Ala Gly Leu Tyr Asp Gln Arg Leu Gly Leu Lys Trp Ile
195 200 205
Arg His Asn Ile Gly Lys Phe Gly Gly Asp Lys Asn Arg Val Thr Leu
210 215 220
Phe Gly Gln Ser Ala Gly Ala Met Ser Ile Ala Leu Gln Asn Phe Ala
225 230 235 240
Tyr Asp Gly Asn Asn His Gly Leu Trp His Ala Ala Ile Met Asn Ser
245 250 255
Gly Gly Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Thr Pro Lys His Pro Thr Val
260 265 270
Glu Gln Ser Phe Lys Arg Leu Ala Asn Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly
275 280 285
Ser Leu Leu Arg Cys Leu Arg Lys Ala Asn Ala Ser Glu Val Gln Thr
290 295 300
Val Ala Ser Asn Leu Thr Ala Gln Ala Gly Gly Thr Phe Pro Ile Pro
305 310 315 320
Gly Ala Leu Ala Trp Leu Pro Leu Val Asp Tyr Glu Leu Ile Thr Asn
325 330 335
Tyr Pro Ser Val Asn Leu Pro Gln Gly Lys Leu Ala Asp Ile Pro Val

ES 2 813 684 T3

			340					345					350			
Ile	Gln	Gly	Asn	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Ala	Gln	Lys	Gln	
			355					360					365			
Leu	Asn	Ser	Ser	Ala	Asp	Phe	Glu	Arg	Trp	Val	Arg	Ser	Ala	Ala	Val	
			370					375					380			
Ile	His	Asn	Thr	Ser	Tyr	Thr	Glu	Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Val	Phe	Glu	
385					390						395				400	
Leu	Tyr	Pro	Asp	Val	Pro	Glu	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn	Ala	Glu	
				405							410				415	
Thr	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Asp	Leu	Asn	Ser	Arg	Gln	Tyr	
			420						425					430		
Pro	Pro	Leu	Thr	Ser	Asn	Gln	Tyr	Lys	Arg	Ser	Ala	Ala	Phe	Phe	Gly	
			435						440					445		
Asp	Phe	Thr	Phe	Gln	Ala	Gln	Arg	Arg	Thr	Tyr	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	
			450				455						460			
Leu	Gly	Trp	Lys	Lys	Asn	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Ser	Tyr	Glu	Phe	Gln	
465					470							475			480	
Gln	Asn	Asp	Lys	Phe	Ala	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	
				485						490					495	
His	Gly	Ala	Asp	Val	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Ile	Arg	Pro	Asp	Gly	Arg	Gln	
			500					505						510		
Lys	Asp	Pro	Val	Leu	Ala	Asp	Arg	Met	Pro	Arg	Ala	Tyr	Ile	Ser	Phe	
			515					520						525		
Val	Tyr	His	His	Asp	Pro	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	
						535						540				
Tyr	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Gln	Met	Lys	Gly	Asp	Asn	Thr	Thr	
545					550						555				560	
Val	Ile	Glu	Asp	Ala	Tyr	Arg	Lys	Glu	Ala	Met	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn	
				565						570					575	
Arg	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Gly	Phe								
			580					585								

<210> 18

<211> 1758

5 <212> ADN

<213> Ustilago maydis

<220>

<223> Que codifica la longitud completa incl. secuencia señal natural y P492L

10

<400> 18

ES 2 813 684 T3

atgaggctgc ctaatctgac actgctcgtg tgggcagcca catccgtcgg cttgggtgctg 60
 gctcttccac aagtctctta caaagctgac gccaccgcct ctgctcccac agtcaaactc 120
 caccaagta ctgtgcgcgg cttggccgac gacaattatg gcctggaaca attctttggc 180
 attccctatg ccaagccacc cgtcggctcg ctccgatttg ccaagccaca gcctctcggc 240
 ccagcctcgt cccacaaaac ggtcatcgac gctactcgat tcggcgacat ctgtatgcag 300
 actggtgcac cctcgcctct ctataacatg agcgaagact gtctcaatct caatgtcgtt 360
 cgtcccaaag gaacaacggc caaggacaag cttccgggtg tggtttgat ctatgggtgg 420
 gcgttcaggc aaggctcaac gccatttac aacgccagcg aattgggtgca gaagagcgtc 480
 gagattggca agccgattgt attgttgcg atcagctatc gagtgggtcc attcggcttc 540
 atcgggtgat ccgagattgc tgacagtgac tcggctacca gcaacgcagg gctgtatgat 600
 cagagattgg gactcaagtg gattcgccac aacattggca agtttgagg tgacaagaac 660
 agggctactc tgttcggtca gagtgcgggc gcgatgagca ttgctctgca gaactttgcc 720
 tatgatggta acaaccacgg gctttggcat gccgcgatca tgaactcggg cggaattgct 780
 ccgggtccac tgtaacgcc caaacaccct acggtggaac agagcttcaa gaggctggcc 840
 aatggcgttg gatgtacagg aggatcactg ctccgggtgc tgcgtaaagc aaacgcgagt 900
 gaggttcaga ccgtggccag taatctgact gctcaagccg gcggaacatt tcccattcct 960
 ggagcgcttg cgtggttgcc actggtcgac tacgagctca tcaccaacta tcccagtgtc 1020
 aaccttccgc aaggtaaact ggccgacatc ccgggtgatcc aaggaaacgc tctggacgaa 1080
 ggaacatctt ttgccagaa acagctcaac agcagcgccg atttcgaacg gtgggtcaga 1140
 agcgctgctg tcatccacaa cacttcgtac accgagcaag cgcttcaaaa ggtctttgaa 1200
 ctctaccag atgttcctga acagggctcg ccattctaca atgcggagac ggccacttct 1260
 gctgctacca cgtcggacct caattcgcgc cagtatccac ctttgaccag caatcagtac 1320
 aagcgttcag cggcgttctt tggcgacttc actttccagg cgcagcgacg aacttatctc 1380
 aaggcggcaa ccttgggctg gaagaagaac aaggccaaag tatggtccta cgagttccag 1440
 cagaacgaca agtttgctaa tggactgga tcgctgttg gccatacca tgggtctgat 1500
 gtcaagtact attttattcg acctgatgga aggcagaag accccgtctt ggccgataga 1560
 atgcctaggg cgtatatcag tttcgtgtat caccatgatc ccacgggtgct cgggtggttc 1620
 gaatggccgc cctacgaaa aggcaagaag ctgctgcaga tgaaaggtga caacacgaca 1680
 gtgatcgagg atgcctatag gaaggaggcg atggatgcgc tgaccaacag gaaagctgcc 1740
 aagggtttg gcttctaa 1758

ES 2 813 684 T3

<210> 19
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Ustilago maydis

5

<220>
 <223> Secuencia de referencia del NCBI: XM_751236.1

<400> 19

10

```

Met Arg Leu Pro Asn Leu Thr Leu Leu Val Trp Ala Ala Thr Ser Val
1      5      10
Gly Leu Val Ser Ala Leu Pro Gln Val Ser Tyr Lys Ala Asp Ala Thr
      20      25      30
Ala Ser Ala Pro Thr Val Lys Leu His Gln Gly Thr Val Arg Gly Leu
      35      40      45
Ala Asp Asp Asn Tyr Gly Leu Glu Gln Phe Phe Gly Ile Pro Tyr Ala
      50      55      60
Lys Pro Pro Val Gly Ser Leu Arg Phe Ala Lys Pro Gln Pro Leu Gly
      65      70      75      80
Pro Ala Ser Ser His Lys Thr Val Ile Asp Ala Thr Arg Phe Gly Asp
      85      90      95
Ile Cys Met Gln Thr Val Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Asn Met Ser Glu
      100     105     110
Asp Cys Leu Asn Leu Asn Val Val Arg Pro Lys Gly Thr Thr Ala Lys
    
```

		115					120					125			
Asp	Lys	Leu	Pro	Val	Leu	Val	Trp	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ala	Phe	Arg	Gln
	130					135					140				
Gly	Ser	Thr	Pro	Ile	Tyr	Asn	Ala	Ser	Glu	Leu	Val	Gln	Lys	Ser	Val
145					150					155					160
Glu	Ile	Gly	Lys	Pro	Ile	Val	Phe	Val	Ala	Ile	Ser	Tyr	Arg	Val	Gly
				165					170					175	
Pro	Phe	Gly	Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Ala	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala
				180				185					190		
Thr	Ser	Asn	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Gln	Arg	Leu	Gly	Leu	Lys	Trp	Ile
		195					200					205			
Arg	His	Asn	Ile	Gly	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu
	210					215					220				
Phe	Gly	Gln	Ser	Ala	Gly	Ala	Met	Ser	Ile	Ala	Leu	Gln	Asn	Phe	Ala
225					230					235					240
Tyr	Asp	Gly	Asn	Asn	His	Gly	Leu	Trp	His	Ala	Ala	Ile	Met	Asn	Ser
				245					250					255	
Gly	Gly	Ile	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Leu	Thr	Pro	Lys	His	Pro	Thr	Val
			260					265					270		
Glu	Gln	Ser	Phe	Lys	Arg	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Gly	Cys	Thr	Gly	Gly
		275					280					285			
Ser	Leu	Leu	Arg	Cys	Leu	Arg	Lys	Ala	Asn	Ala	Ser	Glu	Val	Gln	Thr
	290					295					300				
Val	Ala	Ser	Asn	Leu	Thr	Ala	Gln	Ala	Gly	Gly	Thr	Phe	Pro	Ile	Pro
305					310					315					320
Gly	Ala	Leu	Ala	Trp	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Tyr	Glu	Leu	Ile	Thr	Asn
				325					330					335	
Tyr	Pro	Ser	Val	Asn	Leu	Pro	Gln	Gly	Lys	Leu	Ala	Asp	Ile	Pro	Val
			340					345					350		
Ile	Gln	Gly	Asn	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly	Thr	Ser	Phe	Ala	Gln	Lys	Gln
		355					360					365			
Leu	Asn	Ser	Ser	Ala	Asp	Phe	Glu	Arg	Trp	Val	Arg	Ser	Ala	Ala	Val
	370					375					380				
Ile	His	Asn	Thr	Ser	Tyr	Thr	Glu	Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Val	Phe	Glu
385					390						395				400
Leu	Tyr	Pro	Asp	Val	Pro	Glu	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn	Ala	Glu
				405					410					415	
Thr	Ala	Thr	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Asp	Leu	Asn	Ser	Arg	Gln	Tyr
			420					425					430		
Pro	Pro	Leu	Thr	Ser	Asn	Gln	Tyr	Lys	Arg	Ser	Ala	Ala	Phe	Phe	Gly
		435					440					445			
Asp	Phe	Thr	Phe	Gln	Ala	Gln	Arg	Arg	Thr	Tyr	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr
	450					455					460				
Leu	Gly	Trp	Lys	Lys	Asn	Lys	Ala	Lys	Val	Trp	Ser	Tyr	Glu	Phe	Gln
465					470					475					480
Gln	Asn	Asp	Lys	Phe	Ala	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser	Pro	Leu	Gly	Pro	Tyr
				485					490					495	
His	Gly	Ala	Asp	Val	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Ile	Arg	Pro	Asp	Gly	Arg	Gln
			500					505					510		
Lys	Asp	Pro	Val	Leu	Ala	Asp	Arg	Met	Pro	Arg	Ala	Tyr	Ile	Ser	Phe
		515					520					525			
Val	Tyr	His	His	Asp	Pro	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro
	530					535					540				
Tyr	Gly	Lys	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Gln	Met	Lys	Gly	Asp	Asn	Thr	Thr
545					550					555					560
Val	Ile	Glu	Asp	Ala	Tyr	Arg	Lys	Glu	Ala	Met	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn
				565					570					575	
Arg	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Gly	Phe							
			580					585							

ES 2 813 684 T3

<211> 1578
 <212> ADN
 <213> Rhizoctonia solani

5 <400> 20

ctggactgtg	cggggttatt	caagaaatcg	cagacgctta	tcaaagggat	taatccattt	60
gttgctgagg	tccaccagc	aatgtaacc	ttgttccgg	tggggaacat	agcttacct	120
gaccggtac	ccgacctacc	ggagttttgc	cgtttcggtg	cagaatacaa	cacatcatct	180
aatccaagt	ttagatttga	agtatggcta	ccaacgtcaa	aaaagtggaa	cggtcgtttt	240
gcattcattg	gcaacggtgg	ggatgctggc	ggtgtgaatt	atgctgatat	ggccattcca	300
ttggcgaaat	atgggtttgt	ggtcgcgagc	accaacaccg	gtcacgatgg	aaccacgggt	360
gacggaacat	ttgcgatttc	taatcccag	tcacagattg	atttcgggca	ccgagctgta	420
catctcagta	ccgtgttcgc	aaagacaatc	gcaaaatcat	actatggaaa	gccatctacg	480
tataattact	ggattggatg	ctctagcggg	ggaaaacaag	gactgaaatc	ggccaagca	540
tatcccgcgg	actttgatgg	ggttatcgca	ggtgcaccgg	ctcaatggtg	gcctcatctt	600
aatggcttca	ctaccatgt	gaatatgttg	aatgccaaag	ctaccactcc	gggggagcag	660
attcctacct	cattttttac	ggcgttgaat	caggaggtag	ttgccaatg	tggaaagctg	720
gatggagtcg	acgatgggat	tatcaciaaac	cctaggttgt	gcaagcccg	tcttactcgt	780
gttgcacgcg	gatcaaccaa	tgctctcca	tatgtcaatt	caagtaattg	tttatcgaaa	840
cttcagctcg	taacgctcaa	agctatttac	accaactgga	catcgagcaa	tggagagttc	900
ctgttcccta	ccttcgagcc	cgggaagcgaa	ttgggtggc	caaataccgt	caatggggtt	960
ccatatggac	ctggaccgga	ctacttctta	tatcaggtat	acaacaagac	atccgttcag	1020
aagttgcaaa	tcaatgaggc	cgagcttcaa	agactggtcg	caatagcgga	tgtaaccaac	1080
cctggtcaaaa	gcagagctat	cgaccccaac	ttgaatccat	tcttcaaacg	tgggtgaaaa	1140
ctgttgcaat	atcatgggtt	cgagatcct	cttatcccgt	ctgggagctc	cctgtggtac	1200
tacgaacacg	ttcggagtta	cttcaagaac	gcagacttaa	gcgatcgata	ccgtttgttc	1260
atgatcccag	gtgttgctca	ttgctctgga	gggccaggtg	cagatgcggt	cggacgaccc	1320
ggccaacgta	gcgtttccct	aggcggcgca	ggccaatccc	tatcatttac	tccgcagtac	1380
gacatgatcc	ttgctactat	caactgggta	gagaagggag	tggccccgaa	gtcactcatt	1440
gggacgaagt	acaaaaataa	caatattaga	gaaggcgcaa	aattcacccg	gctattctgt	1500
ccttaccgac	aagaagcaat	ctaccgcggc	gggaacgtga	atgtagctag	cagttattcg	1560
tgcggtgtcc	gcgcttga					1578

<210> 21
<211> 1692
<212> ADN
<213> Rhizoctonia solani

5

<400> 21

ES 2 813 684 T3

atgggctgcg atcgacctcg acaagctctt cattcccttc aagagttcac ggtcatgttc 60
 tctaagtggc tacctatctc ggcgatttta ctatatggtg cttccgcaa agcactggac 120
 tgtgcgggggt tattcaagaa atcgcagacg cttatcaaag ggattaatcc atttgttgct 180
 gaggtccacc cagcaaatgt aacctttggt ccggtgggga acatagctta ccctgacctg 240
 gtacctgacc taccggagt ttgccgtttc ggtgcagaat acaacacatc atctaaatcc 300
 aagtttagat ttgaagtatg gctaccaacg tcaaaaaagt ggaacggctg ttttgcattc 360
 attggcaacg gtggggatgc tggcgggtg aattatgctg atatggccat tccattggcg 420
 aaatatgggt ttgtggtcgc gagcaccaac accggtcacg atggaacca cgggtgacgga 480
 acatttgca tttctaatac cgagtcacag attgatttcg ggcaccgagc tgtacatctc 540
 agtaccgtgt tgcgaaagac aatcgcaaaa tcatactatg gaaagccatc tacgtataat 600
 tactggattg gatgctctag cggaggaaaa caaggactga aatcggccca agcatatccc 660
 gcggactttg atggggttat cgcaggtgca ccggctcaat ggtggcctca tcttaatggc 720
 ttactacct atgtgaatat gttgaatgcc aaagctacca ctccgggggc gacgattcct 780
 acctcatttt ttacggcgtt gaatcaggag gtagttgccc aatgtggaaa gctggatgga 840
 gtcgacgatg ggattatcac aaaccctagg ttgtgcaagc ccgatcttac tcgtgttgca 900
 tgcggatcaa ccaatgcctc tccatattgc aattcaagta attgtttatc gaaacttcag 960
 ctcgtaacgc tcaaagctat ttacaccaac tggacatcga gcaatggaga gttcctgttc 1020
 cctaccttcg agcccgaag cgaatttggg tggccaaata ccgtcaatgg ggttccatat 1080
 ggacctggac ccgactactt cttatatcag gtatacaaca agacatccgt tcagaagttg 1140
 caaatcaatg aggccgagct tcaaagactg gtcgcaatag cggatgtaac caaccctggc 1200
 caaagcagag ctatcgacct caacttgaat ccattcttca aacgtggtgg aaaactgttg 1260
 cagtatcatg ggttcgcaga tcctcttatt ccgtctggga gctccctgtg gtactacgaa 1320
 cacgttcgga gttacttcaa gaacgcagac ttaagcgatc gataccgttt gttcatgatc 1380
 ccaggtgttg ctattgctc tggagggcca ggtgcagatg cgttcggacg acccggccaa 1440
 cgtagcgttt ccctaggcgg cgcaggccaa tcctatcat ttactccgca gtacgacatg 1500
 atccttgcta ctatcaactg ggtagagaag ggagtggccc cgaagtcact cattgggacg 1560
 aagtacaaaa ataacaatat tagagaaggc gcaaaattca cccggctatt ctgtccttac 1620
 ccgcaagaag caatctaccg cggcgggaac gtgaatgtag ctagcagtta ttcgtgcggc 1680
 gtccgcgctt ga 1692

<210> 22

<211> 525

5 <212> PRT

<213> Rhizoctonia solani

<400> 22

ES 2 813 684 T3

Leu Asp Cys Ala Gly Leu Phe Lys Lys Ser Gln Thr Leu Ile Lys Gly
 1 5 10 15
 Ile Asn Pro Phe Val Ala Glu Val His Pro Ala Asn Val Thr Phe Val
 20 25 30
 Pro Val Gly Asn Ile Ala Tyr Pro Asp Pro Val Pro Asp Leu Pro Glu
 35 40 45
 Phe Cys Arg Phe Gly Ala Glu Tyr Asn Thr Ser Ser Lys Ser Lys Phe
 50 55 60
 Arg Phe Glu Val Trp Leu Pro Thr Ser Lys Lys Trp Asn Gly Arg Phe
 65 70 75 80
 Ala Phe Ile Gly Asn Gly Gly Asp Ala Gly Gly Val Asn Tyr Ala Asp
 85 90 95
 Met Ala Ile Pro Leu Ala Lys Tyr Gly Phe Val Val Ala Ser Thr Asn
 100 105 110
 Thr Gly His Asp Gly Thr His Gly Asp Gly Thr Phe Ala Ile Ser Asn
 115 120 125
 Pro Glu Ser Gln Ile Asp Phe Gly His Arg Ala Val His Leu Ser Thr
 130 135 140
 Val Phe Ala Lys Thr Ile Ala Lys Ser Tyr Tyr Gly Lys Pro Ser Thr
 145 150 155 160
 Tyr Asn Tyr Trp Ile Gly Cys Ser Ser Gly Gly Lys Gln Gly Leu Lys
 165 170 175
 Ser Ala Gln Ala Tyr Pro Ala Asp Phe Asp Gly Val Ile Ala Gly Ala
 180 185 190
 Pro Ala Gln Trp Trp Pro His Leu Asn Gly Phe Thr Thr His Val Asn
 195 200 205
 Met Leu Asn Ala Lys Ala Thr Thr Pro Gly Ala Thr Ile Pro Thr Ser
 210 215 220
 Phe Phe Thr Ala Leu Asn Gln Glu Val Val Ala Gln Cys Gly Lys Leu
 225 230 235 240
 Asp Gly Val Asp Asp Gly Ile Ile Thr Asn Pro Arg Leu Cys Lys Pro
 245 250 255
 Asp Leu Thr Arg Val Ala Cys Gly Ser Thr Asn Ala Ser Pro Tyr Val
 260 265 270
 Asn Ser Ser Asn Cys Leu Ser Lys Leu Gln Leu Val Thr Leu Lys Ala
 275 280 285
 Ile Tyr Thr Asn Trp Thr Ser Ser Asn Gly Glu Phe Leu Phe Pro Thr
 290 295 300
 Phe Glu Pro Gly Ser Glu Phe Gly Trp Pro Asn Thr Val Asn Gly Val
 305 310 315 320
 Pro Tyr Gly Pro Gly Pro Asp Tyr Phe Leu Tyr Gln Val Tyr Asn Lys
 325 330 335
 Thr Ser Val Gln Lys Leu Gln Ile Asn Glu Ala Glu Leu Gln Arg Leu
 340 345 350
 Val Ala Ile Ala Asp Val Thr Asn Pro Gly Gln Ser Arg Ala Ile Asp
 355 360 365
 Pro Asn Leu Asn Pro Phe Phe Lys Arg Gly Gly Lys Leu Leu Gln Tyr
 370 375 380
 His Gly Phe Ala Asp Pro Leu Ile Pro Ser Gly Ser Ser Leu Trp Tyr
 385 390 395 400
 Tyr Glu His Val Arg Ser Tyr Phe Lys Asn Ala Asp Leu Ser Asp Arg
 405 410 415
 Tyr Arg Leu Phe Met Ile Pro Gly Val Ala His Cys Ser Gly Gly Pro
 420 425 430
 Gly Ala Asp Ala Phe Gly Arg Pro Gly Gln Arg Ser Val Ser Leu Gly
 435 440 445
 Gly Ala Gly Gln Ser Leu Ser Phe Thr Pro Gln Tyr Asp Met Ile Leu
 450 455 460
 Ala Thr Ile Asn Trp Val Glu Lys Gly Val Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 465 470 475 480

ES 2 813 684 T3

Gly	Thr	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Asn	Ile	Arg	Glu	Gly	Ala	Lys	Phe	Thr
				485					490					495	
Arg	Leu	Phe	Cys	Pro	Tyr	Pro	Gln	Glu	Ala	Ile	Tyr	Arg	Gly	Gly	Asn
			500					505					510		
Val	Asn	Val	Ala	Ser	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gly	Val	Arg	Ala			
		515					520					525			

<210> 23

<211> 563

5 <212> PRT

<213> Rhizoctonia solani

<400> 23

ES 2 813 684 T3

Met Gly Cys Asp Arg Pro Arg Gln Ala Leu His Ser Leu Gln Glu Phe
1 5 10 15
Thr Val Met Phe Ser Lys Trp Leu Pro Ile Ser Ala Ile Leu Leu Tyr
20 25 30
Gly Ala Ser Ala Lys Ala Leu Asp Cys Ala Gly Leu Phe Lys Lys Ser
35 40 45
Gln Thr Leu Ile Lys Gly Ile Asn Pro Phe Val Ala Glu Val His Pro
50 55 60
Ala Asn Val Thr Phe Val Pro Val Gly Asn Ile Ala Tyr Pro Asp Pro
65 70 75 80
Val Pro Asp Leu Pro Glu Phe Cys Arg Phe Gly Ala Glu Tyr Asn Thr
85 90 95
Ser Ser Lys Ser Lys Phe Arg Phe Glu Val Trp Leu Pro Thr Ser Lys
100 105 110
Lys Trp Asn Gly Arg Phe Ala Phe Ile Gly Asn Gly Gly Asp Ala Gly
115 120 125
Gly Val Asn Tyr Ala Asp Met Ala Ile Pro Leu Ala Lys Tyr Gly Phe
130 135 140
Val Val Ala Ser Thr Asn Thr Gly His Asp Gly Thr His Gly Asp Gly
145 150 155 160
Thr Phe Ala Ile Ser Asn Pro Glu Ser Gln Ile Asp Phe Gly His Arg
165 170 175
Ala Val His Leu Ser Thr Val Phe Ala Lys Thr Ile Ala Lys Ser Tyr
180 185 190
Tyr Gly Lys Pro Ser Thr Tyr Asn Tyr Trp Ile Gly Cys Ser Ser Gly
195 200 205
Gly Lys Gln Gly Leu Lys Ser Ala Gln Ala Tyr Pro Ala Asp Phe Asp
210 215 220
Gly Val Ile Ala Gly Ala Pro Ala Gln Trp Trp Pro His Leu Asn Gly
225 230 235 240
Phe Thr Thr His Val Asn Met Leu Asn Ala Lys Ala Thr Thr Pro Gly
245 250 255
Ala Thr Ile Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ala Leu Asn Gln Glu Val Val
260 265 270
Ala Gln Cys Gly Lys Leu Asp Gly Val Asp Asp Gly Ile Ile Thr Asn
275 280 285
Pro Arg Leu Cys Lys Pro Asp Leu Thr Arg Val Ala Cys Gly Ser Thr
290 295 300
Asn Ala Ser Pro Tyr Val Asn Ser Ser Asn Cys Leu Ser Lys Leu Gln
305 310 315 320
Leu Val Thr Leu Lys Ala Ile Tyr Thr Asn Trp Thr Ser Ser Asn Gly
325 330 335
Glu Phe Leu Phe Pro Thr Phe Glu Pro Gly Ser Glu Phe Gly Trp Pro
340 345 350
Asn Thr Val Asn Gly Val Pro Tyr Gly Pro Gly Pro Asp Tyr Phe Leu
355 360 365
Tyr Gln Val Tyr Asn Lys Thr Ser Val Gln Lys Leu Gln Ile Asn Glu
370 375 380
Ala Glu Leu Gln Arg Leu Val Ala Ile Ala Asp Val Thr Asn Pro Gly
385 390 395 400

ES 2 813 684 T3

Gln Ser Arg Ala Ile Asp Pro Asn Leu Asn Pro Phe Phe Lys Arg Gly
 405 410 415
 Gly Lys Leu Leu Gln Tyr His Gly Phe Ala Asp Pro Leu Ile Pro Ser
 420 425 430
 Gly Ser Ser Leu Trp Tyr Tyr Glu His Val Arg Ser Tyr Phe Lys Asn
 435 440 445
 Ala Asp Leu Ser Asp Arg Tyr Arg Leu Phe Met Ile Pro Gly Val Ala
 450 455 460
 His Cys Ser Gly Gly Pro Gly Ala Asp Ala Phe Gly Arg Pro Gly Gln
 465 470 475 480
 Arg Ser Val Ser Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ser Leu Ser Phe Thr Pro
 485 490 495
 Gln Tyr Asp Met Ile Leu Ala Thr Ile Asn Trp Val Glu Lys Gly Val
 500 505 510
 Ala Pro Lys Ser Leu Ile Gly Thr Lys Tyr Lys Asn Asn Asn Ile Arg
 515 520 525
 Glu Gly Ala Lys Phe Thr Arg Leu Phe Cys Pro Tyr Pro Gln Glu Ala
 530 535 540
 Ile Tyr Arg Gly Gly Asn Val Asn Val Ala Ser Ser Tyr Ser Cys Gly
 545 550 555 560
 Val Arg Ala

<210> 24

<211> 1500

5 <212> ADN

<213> Schizophyllum commune

<400> 24

ES 2 813 684 T3

caagggcgact tctccgcaa ctgctcctcc ttcgtc gatg cgatcaccct cgagaacgtc 60
accgtgcagt cgacggagtt cgtcgcggct ggcacgaacg tcagcgtgta cgttcccagag 120
tcgtgcatgt cggcctcgta ccaggtcgtc agcgtgacc tttgccgcgc cacgatgaac 180
gtctcgactt cggaccgcag cggtatccgc ctcgaggcgt ggttcccgca gaactatacc 240
ggtcggttct tgagcacggg caacggcgga attggaggat gcatccagta cagcgacctc 300
gactacgccg cctccctcgg cttcgcgcc gtcggcgcca acaacggcca cgacggcatg 360
accggcgagc ccttcctcaa caaccccgac gtcatcaccg acttcgcctg gcgctccctc 420
cataccggcg tcgtcgtcgg caagcagctc gtcgagacct tctacggcgc cccgcacagc 480
aagtcgtact acctcggctg ctcgaccggc gggcggcagg ggtggaagat ggtgcaggac 540
ttcccggagg actttgatgg cgtagtggcg ggcgcgccgg cgatggcgtt caatgcgctg 600
ttgtattgga gcgggtcgtt ctatacggtc actgggacct cggacgacct aaccttcgtg 660
ccggtcgact tttgggcgaa caatatccac caggcggctc ttgatcagtg cgacgcgctc 720
gacggggcga ccgacggtgt attggagaat ccgatctct gcgacttca cgtgacgcct 780
ctcaactgcg cggacggcaa cagcaccgac tgcttgaccg agacgcaggc ggagaccgtg 840
cgcacggtct tgagcgtat ctatgacgcg aacggcacgc tcgtgtacct gcgctgcag 900
ccgggcgcgg aggtcttggc ggggcagcag cagttcaacg gccagccttt cgacatcact 960
caggattggt accgctacgt catctacaac gactcgacct gggatcctgc gacgctgaac 1020
ctcggcgact acgcagtgc cctcgcgcag aatcccgcc aatcgagac atttaacggc 1080
gacatctccg ctttcgaggc cgcaggaggc aaggtcctgc actaccacgg cctcatggac 1140
ggtctcatct cgtccgaaa ctccaagcgg tactacaagc ttgtgcagga gacgatgggc 1200
aaggactcgt ccgagctcga cgacttctac cgcttcttcc cgatcagcgg catgtcgcac 1260
tgcagcgggg gcgacggggc gtataggatt gggaatgttg atggcggagc ggggacgagt 1320
gcggatgaca atgtgctgat gtcgatggtg cgggtgggtg aggagggcgt ggcgccgaa 1380
gtcgtgcgcg gggcgaatgc taacgtgacc tactggcgtt cgattgcaa gtggcccctg 1440
acgaacaagt acgttggacc tggatcgtat gaggatgagt ctgcatggca gtgcagctga 1500

<210> 25

<211> 1572

5 <212> ADN

<213> Schizophyllum commune

<400> 25

ES 2 813 684 T3

atggctccta cagtgcgctc tctcctcagc gcgctcggca gcgtgctcgc actcgcgcgc 60
 ttcacgaatg cccaaggcga cttctccgcc aactgctcct ccttcgtcga tgcgatcacc 120
 ctcgagaacg tcaccgtgca gtcgacggag ttcgtcgcgg ctggcacgaa cgtcagcgtg 180
 tacgttcccg agtcgtgcat gtcggcctcg taccaggctg tcagcgtga cctttgccgc 240
 gccacgatga acgtctcgac ttcggaccgc agcggtatcc gcctcagggc gtggttcccg 300
 cagaactata ccggtcgggt cttgagcacg ggcaacggcg gaattggagg atgcatccag 360
 tacagcgacc tcgactacgc cgcctccctc ggcttcgccg ccgtcggcgc caacaacggc 420
 cacgacggca tgaccggcga gcccttcctc aacaaccccg acgtcatcac cgacttcgcc 480
 tggcgctccc tccataccgg cgtcgtcgtc ggcaagcagc tcgtcgagac cttctacggc 540
 gccccgcaca gcaagtcgta ctacctcggc tgctcgaccg gcgggcggca ggggtggaag 600
 atggtgcagg acttcccgga ggactttgat ggcgtagtgg cgggcgcgcc ggcgatggcg 660
 ttcaatgcgc tgttgattg gagcgggtcg ttctatacgg tcaactgggac ctccggacgac 720
 ccaaccttcg tgccggtcga cttttggcg aacaatatcc accaggcgggt ccttgatcag 780
 tgcgacgcgc tcgacggggc gaccgacggg gtattggaga atccggatct ctgcgacttc 840
 gacgtgacgc ctctcaactg cgcggacggc aacacgaccg actgcttgac cgagacgcag 900
 gcggagaccg tgccgacggg cttgagcgtc atctatgacg cgaacggcac gctcgtgtac 960
 ccgcgcctgc agccgggcgc ggaggtcttg gcggggcagc agcagttcaa cggccagcct 1020
 ttcgacatca ctcaggattg gtaccgctac gtcatctaca acgactcgac ctgggatcct 1080
 gcgacgctga acctcggcga ctacgcagtc gccctcgcgc agaatcccgc caacatcgag 1140
 acatttaacg gcgacatctc cgctttcgag gccgcaggag gcaaggtcct gcactaccac 1200

 ggctcatgg acggtctcat ctcgtccgac aactccaagc ggtactacaa gcttgtgcag 1260
 gagacgatgg gcaaggactc gtccgagctc gacgacttct accgcttctt cccgatcagc 1320
 ggcatgctgc actgcagcgg gggcgacggg gcgtatagga ttgggaatgt tgatggcgga 1380
 gcggggacga gtgcggatga caatgtgctg atgtcgatgg tgcggtggtt ggaggagggc 1440
 gtggcgccgg aagtcgtgcg cggggcgaat gctaacgtga cctactggcg ttcgcattgc 1500
 aagtggcccc tgacgaacaa gtacgttggg cctggatcgt atgaggatga gtctgcatgg 1560
 cagtgcagct ga 1572

- <210> 26
- <211> 499
- 5 <212> PRT
- <213> Schizophyllum commune

<400> 26

Gln Gly Asp Phe Ser Ala Asn Cys Ser Ser Phe Val Asp Ala Ile Thr
1 5 10 15
Leu Glu Asn Val Thr Val Gln Ser Thr Glu Phe Val Ala Ala Gly Thr
20 25 30
Asn Val Ser Val Tyr Val Pro Glu Ser Cys Met Ser Ala Ser Tyr Gln
35 40 45
Val Val Ser Ala Asp Leu Cys Arg Ala Thr Met Asn Val Ser Thr Ser
50 55 60
Asp Arg Ser Gly Ile Arg Leu Glu Ala Trp Phe Pro Gln Asn Tyr Thr
65 70 75 80
Gly Arg Phe Leu Ser Thr Gly Asn Gly Gly Ile Gly Gly Cys Ile Gln
85 90 95
Tyr Ser Asp Leu Asp Tyr Ala Ala Ser Leu Gly Phe Ala Ala Val Gly
100 105 110
Ala Asn Asn Gly His Asp Gly Met Thr Gly Glu Pro Phe Leu Asn Asn
115 120 125
Pro Asp Val Ile Thr Asp Phe Ala Trp Arg Ser Leu His Thr Gly Val
130 135 140
Val Val Gly Lys Gln Leu Val Glu Thr Phe Tyr Gly Ala Pro His Ser
145 150 155 160
Lys Ser Tyr Tyr Leu Gly Cys Ser Thr Gly Gly Arg Gln Gly Trp Lys
165 170 175
Met Val Gln Asp Phe Pro Glu Asp Phe Asp Gly Val Val Ala Gly Ala
180 185 190
Pro Ala Met Ala Phe Asn Ala Leu Leu Tyr Trp Ser Gly Ser Phe Tyr
195 200 205
Thr Val Thr Gly Thr Ser Asp Asp Pro Thr Phe Val Pro Val Asp Phe
210 215 220
Trp Ala Asn Asn Ile His Gln Ala Val Leu Asp Gln Cys Asp Ala Leu
225 230 235 240
Asp Gly Ala Thr Asp Gly Val Leu Glu Asn Pro Asp Leu Cys Asp Phe
245 250 255
Asp Val Thr Pro Leu Asn Cys Ala Asp Gly Asn Thr Thr Asp Cys Leu
260 265 270
Thr Glu Thr Gln Ala Glu Thr Val Arg Thr Val Leu Ser Ala Ile Tyr
275 280 285
Asp Ala Asn Gly Thr Leu Val Tyr Pro Arg Leu Gln Pro Gly Ala Glu
290 295 300
Val Leu Ala Gly Gln Gln Gln Phe Asn Gly Gln Pro Phe Asp Ile Thr
305 310 315 320
Gln Asp Trp Tyr Arg Tyr Val Ile Tyr Asn Asp Ser Thr Trp Asp Pro
325 330 335

ES 2 813 684 T3

Ala Thr Leu Asn Leu Gly Asp Tyr Ala Val Ala Leu Ala Gln Asn Pro
 340 345 350
 Ala Asn Ile Glu Thr Phe Asn Gly Asp Ile Ser Ala Phe Glu Ala Ala
 355 360 365
 Gly Gly Lys Val Leu His Tyr His Gly Leu Met Asp Gly Leu Ile Ser
 370 375 380
 Ser Asp Asn Ser Lys Arg Tyr Tyr Lys Leu Val Gln Glu Thr Met Gly
 385 390 395 400
 Lys Asp Ser Ser Glu Leu Asp Asp Phe Tyr Arg Phe Phe Pro Ile Ser
 405 410 415
 Gly Met Ser His Cys Ser Gly Gly Asp Gly Ala Tyr Arg Ile Gly Asn
 420 425 430
 Val Asp Gly Gly Ala Gly Thr Ser Ala Asp Asp Asn Val Leu Met Ser
 435 440 445
 Met Val Arg Trp Val Glu Glu Gly Val Ala Pro Glu Val Val Arg Gly
 450 455 460
 Ala Asn Ala Asn Val Thr Tyr Trp Arg Ser His Cys Lys Trp Pro Leu
 465 470 475 480
 Thr Asn Lys Tyr Val Gly Pro Gly Ser Tyr Glu Asp Glu Ser Ala Trp
 485 490 495
 Gln Cys Ser

<210> 27

<211> 523

5 <212> PRT

<213> Schizophyllum commune

<400> 27

ES 2 813 684 T3

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

ES 2 813 684 T3

Glu Asn Pro Asp Leu Cys Asp Phe Asp Val Thr Pro Leu Asn Cys Ala
 275 280 285
 Asp Gly Asn Thr Thr Asp Cys Leu Thr Glu Thr Gln Ala Glu Thr Val
 290 295 300
 Arg Thr Val Leu Ser Ala Ile Tyr Asp Ala Asn Gly Thr Leu Val Tyr
 305 310 315 320
 Pro Arg Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Leu Ala Gly Gln Gln Gln Phe
 325 330 335
 Asn Gly Gln Pro Phe Asp Ile Thr Gln Asp Trp Tyr Arg Tyr Val Ile
 340 345 350
 Tyr Asn Asp Ser Thr Trp Asp Pro Ala Thr Leu Asn Leu Gly Asp Tyr
 355 360 365
 Ala Val Ala Leu Ala Gln Asn Pro Ala Asn Ile Glu Thr Phe Asn Gly
 370 375 380
 Asp Ile Ser Ala Phe Glu Ala Ala Gly Gly Lys Val Leu His Tyr His
 385 390 395 400
 Gly Leu Met Asp Gly Leu Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Arg Tyr Tyr
 405 410 415
 Lys Leu Val Gln Glu Thr Met Gly Lys Asp Ser Ser Glu Leu Asp Asp
 420 425 430
 Phe Tyr Arg Phe Phe Pro Ile Ser Gly Met Ser His Cys Ser Gly Gly
 435 440 445
 Asp Gly Ala Tyr Arg Ile Gly Asn Val Asp Gly Gly Ala Gly Thr Ser
 450 455 460
 Ala Asp Asp Asn Val Leu Met Ser Met Val Arg Trp Val Glu Glu Gly
 465 470 475 480
 Val Ala Pro Glu Val Val Arg Gly Ala Asn Ala Asn Val Thr Tyr Trp
 485 490 495
 Arg Ser His Cys Lys Trp Pro Leu Thr Asn Lys Tyr Val Gly Pro Gly
 500 505 510
 Ser Tyr Glu Asp Glu Ser Ala Trp Gln Cys Ser
 515 520

<210> 28

<211> 1500

5 <212> ADN

<213> Schizophyllum commune

<400> 28

ES 2 813 684 T3

caagacgact tgcctcaga ctgctcggcg tttatcgaca agataatcct cgacaatgtc 60
actgtcacct cgacggagtt tgtggcagcg ggtacgaact tgactgtgta cgtccccaac 120
tcgtgcgggt cgccgtcgta tcaggtcgtc agcaccgacc tctgccgcbc gactatgaac 180
gtcacgacct ctgagcgcag cggcatacgc ctcgaggcct ggttcccga gaactacacc 240
ggccgcttct tgagcactgg taacgggtgt atcggaggat gcattcagta tagcgacatc 300
gactatgccg cctccctcgg tttcgtcgc gtcggcgcca acaacggcca cgacggcatg 360
accggcgcgc ccttcctcaa caaccgcgac gttgtcaccg acttcgcctg gcgctcgtg 420
cacaccggcg tcgtcgtcgg caagcaactc accgagacct tctacggcbc gccccacaac 480
aagtcgtact acctcggctg ctctactggc ggtcggcagg gcttcaaggc ggtgcaggac 540
tttccggacg acttcgacgg cgtcgtcgcg ggcgcgcccg ccttcgcttt caatgggctg 600
ctgtactgga gcggtcgtt cctgcccgtc accggaacct cggaggacct gacctcgtc 660
cccacggatt tctgggcgca gaatatccac gcggaggctc tccagcaatg tgacgcgctc 720
gacggcgcga cggatggggt cctggagaac cggacctct gcgacttca cgtgacgccg 780
ctcatctgca cggacggcaa cacgacgggc tgcctgaccg agacgcaggc ggagaccgtg 840
cgcacggtgc tcagccccat ctacgacaag aacggcacc tctgttacc gcgtctgcag 900
cctggtgcag aggtcctcgc cgggtttgcc cagttcggcg gccagccctt cctttattct 960
acggactggt accgctacgt cgtctacaac gactcgaatt gggacccat gacgctctcc 1020
attgacgact acgccgccgc ccgcgccag aaccccgcca atgtcgagac gttcgagggc 1080
gacatctccg ccttcgcgtc ctccgggtggc aaggtcctgc actaccacgg cctgatggac 1140
ggcctgatct cctccgacaa ctccaagcgg tactacgcc tcgttcagca aaccctcaac 1200
caagagcccg ccgagctcga cgagttctac cgcttcttcc ccatcagcgg gatgtcgcac 1260
tgcagcggcg gcgacggcbc gtaccgcatc gggaacgtcg agggcggcbc gggcacgagt 1320
gcggacgaca acgtgctgat gtccatggtg cgggtgggtg aggagggcgt ggcgccggag 1380
gttgtgcgcg gggcggacgc gaatgcgact tattggcgcg cgcattgcaa gtggccgaag 1440
acgaacaagt acgtcggacc gggggattat gaggatgaga gtgcatggga gtgttcttga 1500

<210> 29

<211> 1569

5 <212> ADN

<213> Schizophyllum commune

<400> 29

ES 2 813 684 T3

atggcgcccc tccgctcagt ttctagcgtg ctggtgggtg cgctcgcgct cctgcgcgcc 60
 gcgcacgcgc aagacgactt cgcctcagac tgctcggcgt ttatcgacaa gataatcctc 120
 gacaatgtca ctgtcacctc gacggagttt gtggcagcgg gtacgaactt gactgtgtac 180
 gtccccaaact cgtgcgggtc gccgtcgtat caggtcgtca gcaccgacct ctgccgcgcg 240
 actatgaacg tcacgacctc tgagcgcagc ggcatacgcc tcgaggcctg gttcccgcag 300
 aactacaccg gccgcttctt gagcactggt aacggtggta tcggaggatg cattcagtat 360
 agcgcacatcg actatgccgc ctccctcgggt ttcgctgccc tcggcgccaa caacggccac 420
 gacggcatga ccggcgagcc cttcctcaac aacccggacg ttgtcaccga cttcgcctgg 480
 cgctcgcctgc acaccggcgt cgtcgtcggc aagcaactca ccgagacctt ctacggcgcg 540
 ccccaacaaca agtcgtacta cctcggctgc tctactggcg gtcggcaggg cttcaaggcg 600
 gtgcaggact ttccggacga cttcgacggc gtcgtcgcgg gcgcgccggc cttcgccttc 660
 aatgggctgc tgtactggag cggctcgttc ctgcccgtca ccggaacctc ggaggacctg 720
 accttcgtcc ccacggattt ctgggcgcag aatatccacg cggaggctct ccagcaatgt 780
 gacgcgctcg acggcgcgac ggatggggtc ctggagaacc cggacctctg cgacttcgac 840
 gtgacgccgc tcatctgcac ggacggcaac acgacgggct gcctgaccga gacgcaggcg 900
 gagaccgtgc gcacggtgct cagccccatc tacgacaaga acggcaccct cgtgtacctg 960
 cgtctgcagc ctggtgcaga ggtcctcgcc gggtttgccc agttcggcgg ccagcccttc 1020
 ctttattcta cggactggta ccgctacgtc gtctacaacg actcgaattg ggaccccatg 1080
 acgctctcca ttgacgacta cgccgccgcc cgcgcccaga accccgcaa tgtcgagacg 1140
 ttcgagggcg acatctccgc cttcgcgtcc tccggtggca aggtcctgca ctaccacggc 1200
 ctgatggacg gcctgatctc ctccgacaac tccaagcggg actacgccct cgttcagcaa 1260
 accctcaacc aagagcccgc cgagctcgac gagttctacc gcttcttccc catcagcggg 1320
 atgtcgcact gcagcggcgg cgacggcgcg taccgcatcg ggaacgtcga gggcggcgcg 1380
 ggcacgagtg cggacgacaa cgtgctgatg tccatggtgc ggtgggtgga ggagggcgtg 1440
 gcgccggagg ttgtgcgcgg ggcggacgcg aatgcgactt attggcgcgc gcattgcaag 1500
 tggccgaaga cgaacaagta cgtcggaccg ggggattatg aggatgagag tgcattggag 1560
 tgttcttga 1569

<210> 30

<211> 499

5 <212> PRT

<213> Schizophyllum commune

<400> 30

ES 2 813 684 T3

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

Asp Val Thr Pro Leu Ile Cys Thr Asp Gly Asn Thr Thr Gly Cys Leu
 260 265 270
 Thr Glu Thr Gln Ala Glu Thr Val Arg Thr Val Leu Ser Pro Ile Tyr
 275 280 285
 Asp Lys Asn Gly Thr Leu Val Tyr Pro Arg Leu Gln Pro Gly Ala Glu
 290 295 300
 Val Leu Ala Gly Phe Ala Gln Phe Gly Gly Gln Pro Phe Leu Tyr Ser
 305 310 315 320
 Thr Asp Trp Tyr Arg Tyr Val Val Tyr Asn Asp Ser Asn Trp Asp Pro
 325 330 335
 Met Thr Leu Ser Ile Asp Asp Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Gln Asn Pro
 340 345 350
 Ala Asn Val Glu Thr Phe Glu Gly Asp Ile Ser Ala Phe Ala Ser Ser
 355 360 365
 Gly Gly Lys Val Leu His Tyr His Gly Leu Met Asp Gly Leu Ile Ser
 370 375 380
 Ser Asp Asn Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Leu Val Gln Gln Thr Leu Asn
 385 390 395 400
 Gln Glu Pro Ala Glu Leu Asp Glu Phe Tyr Arg Phe Phe Pro Ile Ser
 405 410 415
 Gly Met Ser His Cys Ser Gly Gly Asp Gly Ala Tyr Arg Ile Gly Asn
 420 425 430
 Val Glu Gly Gly Ala Gly Thr Ser Ala Asp Asp Asn Val Leu Met Ser
 435 440 445
 Met Val Arg Trp Val Glu Glu Gly Val Ala Pro Glu Val Val Arg Gly
 450 455 460
 Ala Asp Ala Asn Ala Thr Tyr Trp Arg Ala His Cys Lys Trp Pro Lys
 465 470 475 480
 Thr Asn Lys Tyr Val Gly Pro Gly Asp Tyr Glu Asp Glu Ser Ala Trp
 485 490 495
 Glu Cys Ser

<210> 31

<211> 522

5 <212> PRT

<213> Schizophyllum commune

<400> 31

ES 2 813 684 T3

Met	Ala	Pro	Leu	Arg	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	
Leu	Leu	Arg	Ala	Ala	His	Ala	Gln	Asp	Asp	Phe	Ala	Ser	Asp	Cys	Ser
			20					25					30		
Ala	Phe	Ile	Asp	Lys	Ile	Ile	Leu	Asp	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Thr
		35					40					45			
Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Val	Tyr	Val	Pro	Asn	Ser
50						55					60				
Cys	Gly	Ser	Pro	Ser	Tyr	Gln	Val	Val	Ser	Thr	Asp	Leu	Cys	Arg	Ala
65					70						75				80
Thr	Met	Asn	Val	Thr	Thr	Ser	Glu	Arg	Ser	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala
				85					90					95	
Trp	Phe	Pro	Gln	Asn	Tyr	Thr	Gly	Arg	Phe	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Gly
			100					105					110		
Gly	Ile	Gly	Gly	Cys	Ile	Gln	Tyr	Ser	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ala	Ala	Ser
		115					120					125			
Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Asn	Asn	Gly	His	Asp	Gly	Met	Thr
130						135					140				
Gly	Glu	Pro	Phe	Leu	Asn	Asn	Pro	Asp	Val	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Trp
145					150					155					160
Arg	Ser	Leu	His	Thr	Gly	Val	Val	Val	Gly	Lys	Gln	Leu	Thr	Glu	Thr
				165					170					175	
Phe	Tyr	Gly	Ala	Pro	His	Asn	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Cys	Ser	Thr
			180					185					190		

ES 2 813 684 T3

Gly Gly Arg Gln Gly Phe Lys Ala Val Gln Asp Phe Pro Asp Asp Phe
 195 200 205
 Asp Gly Val Val Ala Gly Ala Pro Ala Phe Ala Phe Asn Gly Leu Leu
 210 215 220
 Tyr Trp Ser Gly Ser Phe Leu Pro Val Thr Gly Thr Ser Glu Asp Pro
 225 230 235 240
 Thr Phe Val Pro Thr Asp Phe Trp Ala Gln Asn Ile His Ala Glu Val
 245 250 255
 Leu Gln Gln Cys Asp Ala Leu Asp Gly Ala Thr Asp Gly Val Leu Glu
 260 265 270
 Asn Pro Asp Leu Cys Asp Phe Asp Val Thr Pro Leu Ile Cys Thr Asp
 275 280 285
 Gly Asn Thr Thr Gly Cys Leu Thr Glu Thr Gln Ala Glu Thr Val Arg
 290 295 300
 Thr Val Leu Ser Pro Ile Tyr Asp Lys Asn Gly Thr Leu Val Tyr Pro
 305 310 315 320
 Arg Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Leu Ala Gly Phe Ala Gln Phe Gly
 325 330 335
 Gly Gln Pro Phe Leu Tyr Ser Thr Asp Trp Tyr Arg Tyr Val Val Tyr
 340 345 350
 Asn Asp Ser Asn Trp Asp Pro Met Thr Leu Ser Ile Asp Asp Tyr Ala
 355 360 365
 Ala Ala Arg Ala Gln Asn Pro Ala Asn Val Glu Thr Phe Glu Gly Asp
 370 375 380
 Ile Ser Ala Phe Ala Ser Ser Gly Gly Lys Val Leu His Tyr His Gly
 385 390 395 400
 Leu Met Asp Gly Leu Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala
 405 410 415
 Leu Val Gln Gln Thr Leu Asn Gln Glu Pro Ala Glu Leu Asp Glu Phe
 420 425 430
 Tyr Arg Phe Phe Pro Ile Ser Gly Met Ser His Cys Ser Gly Gly Asp
 435 440 445
 Gly Ala Tyr Arg Ile Gly Asn Val Glu Gly Gly Ala Gly Thr Ser Ala
 450 455 460
 Asp Asp Asn Val Leu Met Ser Met Val Arg Trp Val Glu Glu Gly Val
 465 470 475 480
 Ala Pro Glu Val Val Arg Gly Ala Asp Ala Asn Ala Thr Tyr Trp Arg
 485 490 495
 Ala His Cys Lys Trp Pro Lys Thr Asn Lys Tyr Val Gly Pro Gly Asp
 500 505 510
 Tyr Glu Asp Glu Ser Ala Trp Glu Cys Ser
 515 520

REIVINDICACIONES

1. Una enzima con actividad ácido clorogénico esterasa y actividad feruloil esterasa que comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 y que no comprende la SEQ ID NO: 3.
2. La enzima de la reivindicación 1, donde la enzima tiene una masa molecular de aproximadamente 71 kDa.
3. La enzima de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una secuencia que tiene la SEQ ID NO: 1.
4. La enzima de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima se puede obtener a partir de un basidiomiceto.
5. La enzima de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima se puede obtener mediante expresión en levadura, preferentemente, en *Pichia pastoris*.
6. Un ácido nucleico que codifica la enzima de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no comprende la SEQ ID NO. 4.
7. El ácido nucleico de la reivindicación 6, donde el ácido nucleico es un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6 enlazado funcionalmente a un promotor heterólogo, donde el ácido nucleico que codifica la enzima está preferentemente enlazado funcionalmente a una secuencia señal heteróloga.
8. Un procedimiento para preparar una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende transformar una célula hospedadora adecuada con el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 y, opcionalmente, aislar la enzima.
9. Una célula hospedadora heteróloga que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7.
10. Uso de una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el reblandecimiento de masa.
11. Un procedimiento para preparar un producto para horneado, que comprende poner en contacto masa del producto para horneado con una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
12. Uso de una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para hidrolizar un sustrato y/o generar un producto seleccionado del grupo que comprende
- a. un ácido clorogénico, es decir, un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico, preferentemente, ácido cafeico; y/o
 - b. un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, preferentemente, ácido cafeico.
13. Un procedimiento para hidrolizar un sustrato seleccionado del grupo que comprende
- a. un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico, preferentemente, ácido cafeico; y/o
 - b. un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, preferentemente, ácido cafeico, comprendiendo el procedimiento una etapa donde una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 se pone en contacto con dicho sustrato en condiciones adecuadas.
14. Un procedimiento para preparar un producto seleccionado del grupo que comprende
- a. ácido quínico;
 - b. ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, preferentemente, ácido cafeico;
 - c. un sacárido;
 - d. un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico, preferentemente, ácido cafeico;
 - e. un éster de un sacárido o alcohol C1 o C2 con ácido fenilpropanoico que opcionalmente comprende exactamente un metoxi en el anillo benzoico, preferentemente, ácido cafeico; y/o
 - f. un material natural tal como un alimento que comprende una cantidad reducida de un éster de ácido quínico con un ácido fenilpropanoico, preferentemente, ácido cafeico;
- comprendiendo el procedimiento una etapa donde una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 se pone

en contacto con los eductos de la reacción catalizada, lo que genera el producto correspondiente en condiciones adecuadas, donde la enzima se pone en contacto preferentemente con un material natural tal como material de desecho agroindustrial, tal como pulpa de café, salvado de trigo desalmidonado y pectina de remolacha azucarera o pulpa de papel;

5 donde, opcionalmente, el producto se aísla.

15. Un procedimiento para reducir los riesgos dietéticos que implica el consumo de ácido clorogénico, que comprende poner en contacto un producto alimenticio con una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

10 16. Un producto alimenticio que comprende una enzima de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el producto alimenticio es opcionalmente un producto para horneado seleccionado del grupo que comprende producto prehorneado y un producto horneado.

FIG. 1:

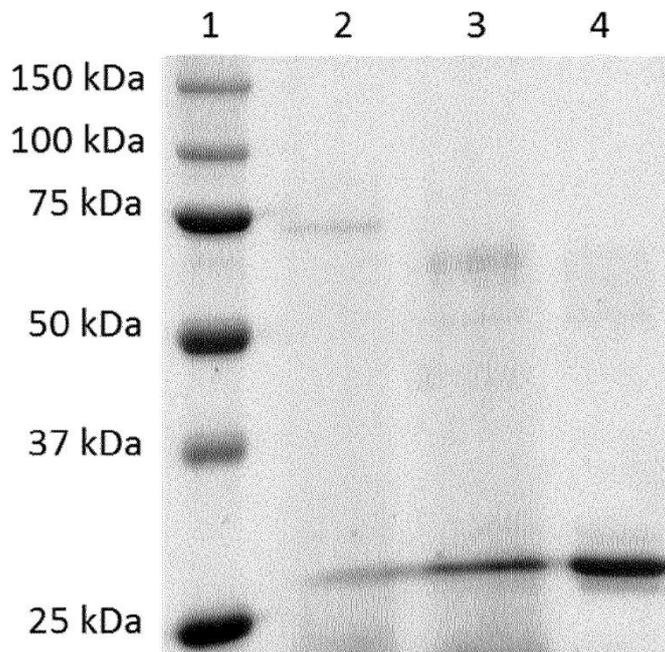


Fig. 2A

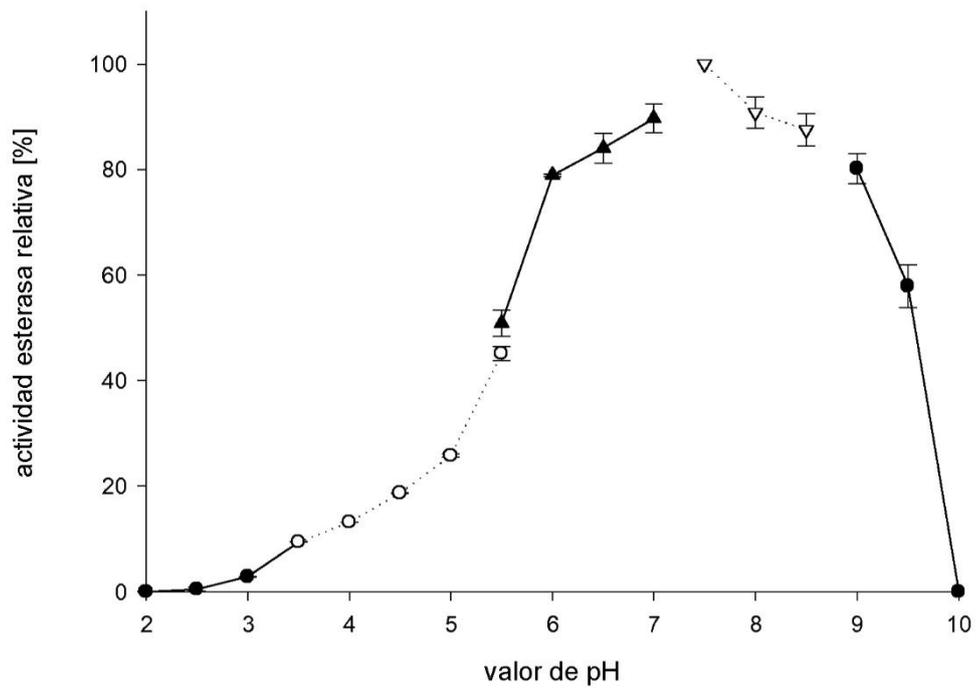
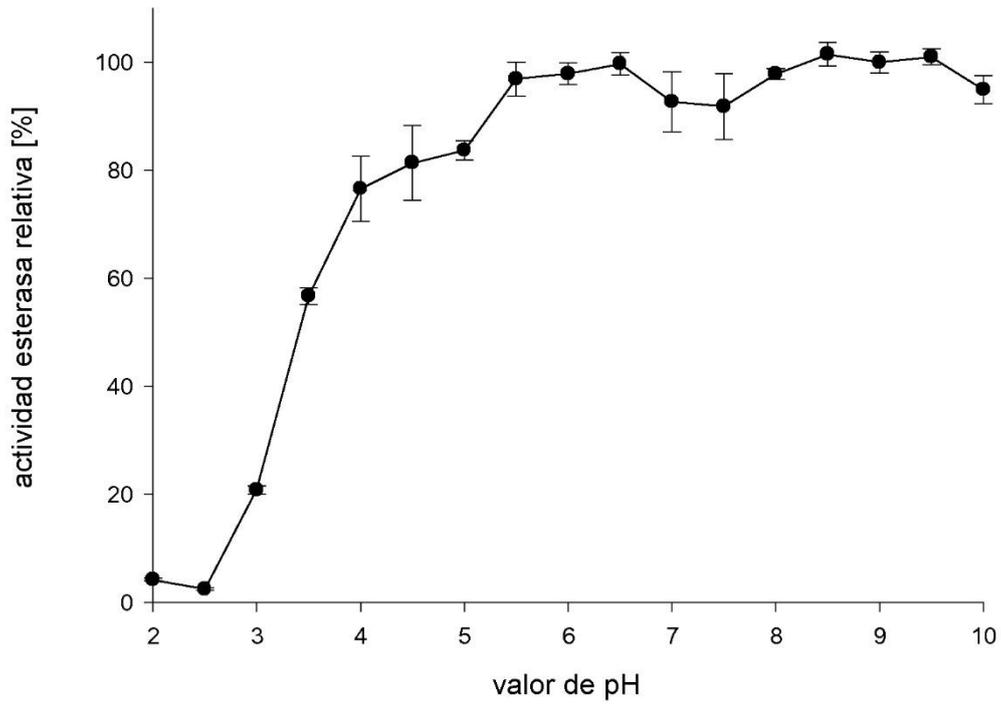


FIG. 2B:



C

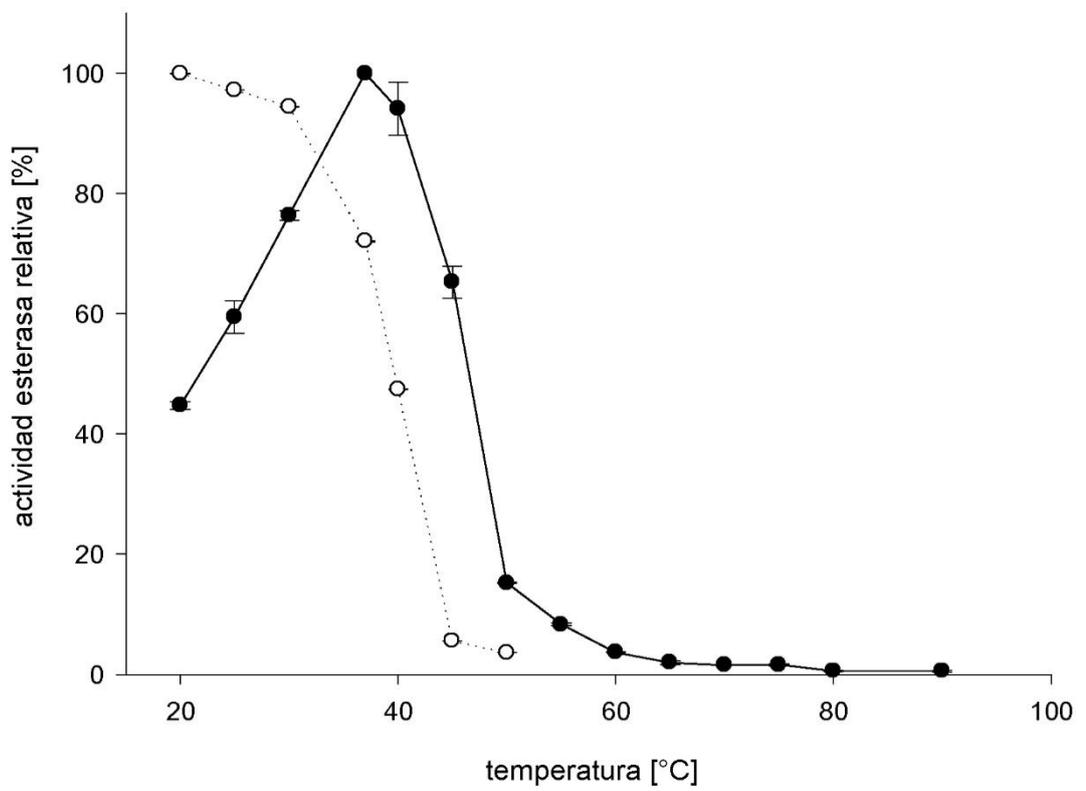


Fig. 4A

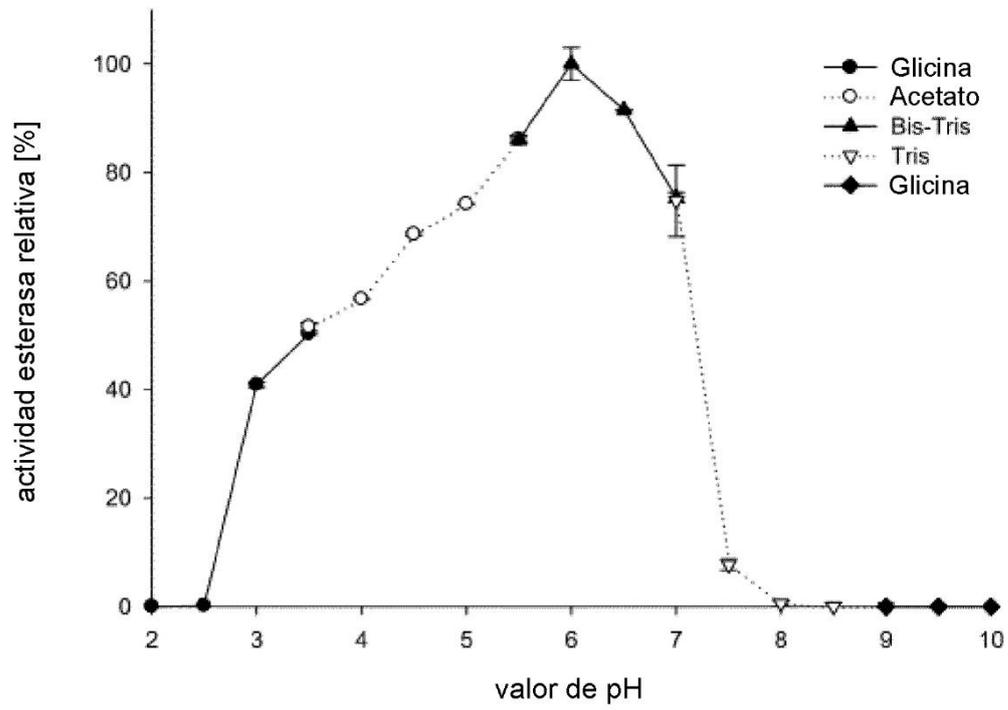


Fig. 4B

