

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



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

PCT

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

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

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

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

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

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

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

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **LÓPEZ GARCÍA, Paloma** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones científicas, C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 MADRID (ES). **WERNING, María, Laura** [AR/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones científicas, C/ Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 MADRID (ES). **IRASTORZA IRIBAS, Ana** [ES/ES]; Universidad del País Vasco, CAMPUS DE LEIOA, E-48940 LEIOA

(ES). **DUEÑAS CHASCO, María Teresa** [ES/ES]; Universidad del País vasco, CAMPUS DE LEIOA, E-48940 LEIOA (ES). **IBARBURU LÓPEZ, Idoia** [ES/ES]; Universidad del País Vasco, CAMPUS DE LEIOA, E-48940 LEIOA (ES). **NAVAS MÉNDEZ, Jesús** [ES/ES]; Universidad de Cantabria, Pabellon de Gobierno, s/n, E-39005 SANTANDER (ES).

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

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

Publicada:

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

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

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

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

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

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

WO 2006/032718 A1

TÍTULO**SECUENCIAS, VECTORES Y CÉLULAS GTF Y SUS APLICACIONES EN EL SECTOR ALIMENTARIO****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

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

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

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

Las bacterias Gram-positivas y específicamente las bacterias ácido-lácticas (LAB) producen varios EPS de interés industrial. Un claro ejemplo son los dextranos producidos por *Leuconostoc mesenteroides*, empleados en la síntesis de matrices utilizadas en técnicas de cromatografía, para el recubrimiento de superficies metálicas o para estabilizar jarabes. Además, algunas estirpes de LAB pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* producen EPSs que están siendo utilizadas *in situ* para mejorar la textura de productos fermentados como el yogourt y el queso (de Vos (1999) Curr. Opin. Biotech. 10: 483-484). Sin embargo, en la actualidad la producción a gran escala de los EPSs de LAB es restringida debido a los bajos niveles producidos

(40-800 mg l⁻¹ de cultivo) en comparación con *Xanthomonas campestris* que puede producir de 10 a 25 g l⁻¹ o convertir del 60 al 70% del azúcar sustrato en xantano por cultivo continuo.

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN

5 Descripción breve

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 Descripción detallada

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

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

La comparación de la secuencia de dicho gen *gtf* con las depositadas en las bases de datos mostró la ausencia de homologías significativas. Sin embargo, al comparar la secuencia de la proteína GTF producto del gen *gtf* se observó que es homóloga a las glicosiltransferasas de la familia COG1215. Además, la proteína GTF presenta una homología relativamente elevada (34%)
30 con la proteína Tts de *Streptococcus pneumoniae*, una glicosiltransferasa que es el único enzima requerido para la biosíntesis y secreción de un β -D-glucano similar al de *P. damnosus* (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061). Esta característica se contrapone con los complejos operones (compuestos por unos 10 genes) que codifican las proteínas requeridas para la síntesis

y secreción de los heteropolisacáridos y homopolisacáridos bacterianos utilizados actualmente a nivel industrial (Jolly y Stingele (2001) Int. Dairy J. 11: 733-745) y representa una clara e importante ventaja técnica. En consecuencia, una proteína con características similares a la Tts, pero proveniente de un microorganismo no patógeno y con calidad alimentaria tendría un potencial para la producción de β -D-glucanos por manipulación genética y de interés industrial.

El mismo equipo investigador ha observado, mediante la caracterización por PCR del gen *gtf* en distintas estirpes bacteriana productoras de β -D-glucano, de homo- o hetero-polisacáridos, que la proteína GTF está implicada específicamente en la biosíntesis de homopolisacáridos constituidos por β -D-glucano y no otro tipo de homo- o hetero-polisacáridos (ver solicitud de patente española "PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE β -GLUCANOS" (2004)).

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

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

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

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

La molécula de DNA GTF de la invención procede de *P. damnosus* 2.6 y puede encontrarse en formas parecidas en otros microorganismos, entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención: *Lactobacillus* sp. y *Oenococcus oeni*, donde pueden estar de

forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica en el que el organismo transformado reproduzca dichas moléculas de DNA. La secuencia de DNA de la invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del DNA de cualquier microorganismo que la contenga, mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos, preparados gracias a la información de la secuencia de nucleótidos de dicha molécula de DNA, proporcionada en esta invención por un experto en la materia. Resultados obtenidos por el mismo equipo investigador indican que la producción de β -glucano por las estirpes *Pediococcus damnosus* 2.6, *Lactobacillus* sp G-77 y *Oenococcus oeni* O77 requiere la expresión del gen *gff*, cuyas formas alélicas son prácticamente idénticas en todas las estirpes, aunque su localización genómica y los elementos reguladores de su expresión son diferentes en cada estirpe (ver solicitud de patente "PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE β -GLUCANOS" (2004))

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Por otro lado, estos resultados permiten abrir nuevas posibilidades para transformar un sistema bacteriano GRAS, es decir, microorganismos - entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, estirpes de LAB pertenecientes a los géneros del siguiente grupo: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus* - que pueden ser utilizados en la industria alimentaria en procesos de fermentación de alimentos, entre otros, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, pertenecientes al siguiente grupo: productos lácteos, bebidas alcohólicas y avena, que permite la mejora de la textura de los productos fermentados, ej. yogourt y el queso (de Vos (1999) Curr. Opin. Biotech. 10: 483-484) o la mejora de sus cualidades organolépticas (Olof Mårtensson y cols. (2002) Nutrition Research 22: 1461-1473).

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

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

Figura 3.- Detección en *S. pneumoniae* y en *L. lactis* de la expresión de *gtf* y *gfp* respectivamente por detección microscópica de aglutinación y por microscopía de fluorescencia. Contiene fotografías de cultivos celulares de las cepas de *S. pneumoniae*: R61[pLS1RGFP] (A y B) y R61[pGTF] (C y D) y de *L. lactis* : MG1363[pLS1RGFP] y MG1363[pGTF] detectados por microscopía de contraste de fase (A, C, E y G) y por microscopía de fluorescencia (B, D, F y H).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1.-Clonaje y caracterización del gen *gtf* de *P. damnosus* 2.6.

El clonaje de la región 5' del gen se realizó por amplificación de PCR utilizando el DNA total de los plásmidos portados por *P. damnosus* 2.6 y los oligonucleótidos degenerados 5'-TAYGAYAAAYACNCARGARGT-3' (Oligo I, SEQ ID NO1) y 5'-ACRAARTARTCRTARTCRTG-3' (Oligo II, SEQ ID NO2) (Y = T o C; W; R = A o G; N = A, C, G o T). Estos oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia de aminoácidos conservada de la glicosil transferasa de *P. damnosus* IOEB8801 (Walling et al. (2001) Lait 81: 289-300), ya que la secuencia de nucleótidos del gen codificante no ha sido publicada, ni depositada en los bancos de datos de secuencias de DNA. El fragmento amplificado de 1,8 kb fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y el plásmido recombinante obtenido fue establecido en *Escherichia coli* DH5 α . La determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA reveló la existencia de un marco de lectura

30

abierta carente de su región amino terminal. La secuencia de DNA obtenida fue utilizada para sintetizar los oligonucleótidos 5'-ACGCCCTGCGTGTTATCATA-3' (SEQ ID NO3) y 5'-TGTGTAATGGCACTCACGAC-3' (SEQ ID NO4) y mediante reacción de PCR reversa se amplificó el extremo 5' del gen *gff*, que fue clonado utilizando el mismo vector, método y bacteria huésped que se emplearon para clonar el extremo 3' del gen. La secuencia de 3352 nucleótidos de las regiones clonadas se muestra en la SEQ ID NO5 (nucleótidos 1-621 región 3' del gen *mobA*, nucleótidos 819-1085 gen hipotético ORF1 y nucleótidos 1282-2982 del gen *gff* -región CDS). El gen *gff* (SEQ ID NO 9) codifica la proteína GTF de 567 aminoácidos detallados en la SEQ ID NO6.

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

Resultados obtenidos por el mismo equipo investigador indican que la producción de β -glucano por las estirpes *Pediococcus damnosus* 2.6, *Lactobacillus* sp G-77 y *Oenococcus oeni* O77 requiere la expresión del gen *gff*, cuyas formas alélicas son prácticamente idénticas en todas las estirpes, aunque su localización genómica y los elementos reguladores de su expresión son diferentes en cada estirpe (ver solicitud de patente española "PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRODUCTORAS DE β -GLUCANOS (2004))

30

Ejemplo 2.- Construcción del vector pGTF que permite la sobreexpresión de la proteína GTF de *Pediococcus damnosus* 2.6.

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

Ejemplo 3.-Detección *in vitro* de la función de GTF integrada en membranas de *S. pneumoniae*.

La glicosiltransferasa Tts de *S. pneumoniae* es una proteína integral de membrana (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061). El análisis de la predicción de la localización topológica de la GTF de *P. damnosus* 2.6 utilizando el programa SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>) reveló que el dominio catalítico de la

proteína (aminoácidos 83 a 377 está localizado en el citoplasma bacteriano) y que existen seis regiones transmembranales: dos localizadas en el extremo amino terminal de la proteína precediendo al dominio catalítico de ésta y cuatro localizadas en su región carboxilo (Figura 2). Por los motivos antedichos se procedió a purificar membranas de las estirpes de *S. pneumoniae* R61 portadoras del plásmido pGTF o del plásmido vector pLS1RGFP y determinar la actividad glicosiltransferasa utilizando como sustrato UDP-glucosa. Para ello, células de las estirpes de *S. pneumoniae* R61[pLS1RGFP] (Nieto y cols. (2000) Plasmid 43: 205-213) y R61[pGTF] fueron crecidas en 1 l de medio Tood-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5%, sacarosa al 0,1% y maltosa al 0,8% hasta una A_{650} de 0,4. Los cultivos de las dos estirpes mostraron un tiempo de duplicación similar (Tabla 1), indicando que la expresión de la fusión P_M -*gtf-gfp* no tenía un efecto deletéreo para *S. pneumoniae*. La valoración de la expresión a partir del promotor P_M se realizó mediante la determinación de la fluorescencia debida a la proteína GFP de 0,1 ml de los cultivos por espectrometría de fluorescencia (Nieto y cols. (2000) Plasmid 43: 205-213). Los resultados obtenidos (Tabla 1) mostraron, que en las dos estirpes analizadas existía expresión de la proteína GFP siendo ligeramente inferior en la R61[pGTF] que en la estirpe portadora del vector, efecto observado en construcciones previas al intercalar un gen entre el promotor P_M y el gen *gfp* (resultados no mostrados).

Para realizar la obtención de membrana requeridas para determinar la actividad glicosiltransferasa, las células presentes en 1 l litro de medio fueron sedimentadas por centrifugación a 12000 x g durante 20 minutos (min) a 4°C y resuspendidas en el tampón A (70 mM Tris.HCl pH 7,0, 9 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) con 0.2 M fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y sedimentadas por centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4°C. Las bacterias resuspendidas en el tampón A fueron sometidas a rotura mecánica pasándolas dos veces por una prensa de French (Aminco). El homogeneizado fue centrifugado a 12000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue otra vez centrifugado a 12000 x g durante 30 min a 4°C. Las membranas sedimentadas fueron resuspendidas en 2 ml de tampón A conteniendo 0.2 mM de PMSF y almacenadas a -80°C. La concentración de proteínas de las preparaciones de membranas se determinó utilizando el sistema BCA Protein Assay (Pierce). La determinación de la actividad glicosiltransferasa fue realizada utilizando 30 μ M (0.1 μ Ci) UDP-[¹⁴C]glucosa (actividad específica 333 mCi/mmol) en un tampón A suplementado con 50 mM NaCl en un volumen total de 100 μ l y membranas en un rango de concentraciones comprendido entre 0,05 y 0,5 mg ml⁻¹ de proteínas. Las reacciones se realizaron por incubación a 30°C durante 15 min. Las reacción fue terminada por adición de SDS a una concentración final del 0,5% e incubación a 37°C durante 15 min.

Seguidamente se adicionó seroalbumina bovina a una concentración final del 0,4% y 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Después de una incubación durante 30 min a 0°C, las mezclas se filtraron a través de filtros Wathman GF/A y fueron lavadas con 15 ml de TCA al 10%. Los filtros se secaron a 65°C durante 20 min y la radioactividad presente en ellos se midió en un contador de centelleo (LKB Wallack). Los resultados obtenidos (Tabla 1) revelaron la existencia de actividad glicosiltransferasa en las membranas de las dos estirpes analizadas. Los niveles fueron aproximadamente 2,5 veces superiores en la estirpe R61[pGTF] en comparación con la estirpe control. Este incremento era presumiblemente debido a la actividad glicosiltransferasa de la GTF de *P. damnosus*. En el caso de la estirpe control R61[pLS1RGFP] los niveles de actividad detectados podrían ser debidos a los productos de los genes *cpoA* y *epsG* cromosomales de *S. pneumoniae*, cuya función es desconocida, pero que por homología están propuestos como glicosiltransferasas en el banco de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>).

Tabla 1. Efecto de la inducción de la fusión $P_{M-gtf-gfp}$ en el crecimiento, niveles de GFP y de actividad glicosiltransferasa en *S. pneumoniae*

Estirpe	¹ Tiempo de duplicación (min)	² Fluorescencia de la GFP (unidades arbitrarias)	³ Actividad glicosil transferasa (unidades)
R61[pLS1RGFP]	30	152,85	243,71 _{±42}
R61[pGTF]	35	98,7	615,46 _{±193}

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

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

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

25

Ejemplo 4.-Detección de la función de GTF *In vivo* en *S. pneumoniae* y *L. lactis*.

Los resultados de detección de actividad glicosiltransferasa indicaban que el plásmido pGTF codifica la proteína GTF en forma activa. Ya que los anticuerpos desarrollados frente a la cápsula del serotipo 37 de *S. pneumoniae* son muy específicos y no reaccionan con estirpes no capsuladas o de otros serotipos de *S. pneumoniae* o con otras bacterias, se procedió a utilizar dichos anticuerpos para valorar *in vivo* la expresión funcional de la GTF de *Pediococcus* tanto en

30

S. pneumoniae R61[pGTF] como en la estirpe MG1363 de *Lactococcus lactis* (a la cual se había transferido el plásmido pGTF por transformación). La expresión funcional de la GTF fue determinada mediante la técnica de aglutinación utilizando anticuerpos desarrollados frente a la cápsula de *S. pneumoniae* serotipo 37 y por microscopía (Llul y cols (1999) J. Biol. Chem. 24: 21053-21061). Células de las cepas de *S. pneumoniae* R61[pLS1RGFP] y R61[pGTF] fueron
5 crecidas en medio Tood-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5%, sacarosa al 0,1% y maltosa al 0,8% a una A_{660} de 0,4. Células de las cepas de *L. lactis* MG1363 [pLS1RGFP] y MG1363[pGTF] fueron crecidas en medio Tood-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5% y maltosa al 5% a una A_{660} de 0,5. Un ml de cada uno de los cultivos fue
10 sedimentado por centrifugación y las células fueron resuspendidas en 100 μ l de tampón PBS pH 8,0 (10 mM Na_2HPO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 3 mM KCl). Diez μ l de cada uno de los cultivos fueron mezclados con 10 μ l del anticuerpo desarrollado frente al serotipo 37 neumocócico (Statens Seruminstitut, Dinamarca) y mantenidos a 4°C durante 2 horas. Las preparaciones fueron analizadas por microscopía de contraste de fase y fluorescencia utilizando un microscopio Zeiss
15 Axioplan (Universal microscope) con filtros de fluorescencia de excitación Standard FITC set D480/30 y emisión TBP 460/530/610. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Figura 3. La fluorescencia de la proteína GFP permitió detectar por microscopía de fluorescencia la existencia de expresión génica a partir del promotor P_M de pLS1RGFP y de pGTF en las células de *S. pneumoniae* (Figuras 3B y 3D) y *L. lactis* (Figuras 3F y 3H) inducidas con maltosa. Las
20 imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia y contraste de fase revelaron que sólo las células de *S. pneumoniae* (Figuras 3C y 3D) y de *L. lactis* (Figuras 3G y 3H) portadoras del plásmido pGTF e inducidas con maltosa eran capaces de aglutinar. Estos resultados muestran que pGTF confiere a *S. pneumoniae* y a *L. lactis* la capacidad de sintetizar el exopolisacárido.

REIVINDICACIONES

- 1.- Secuencia de DNA GTF caracterizada porque proviene de bacterias ácido lácticas GRAS, codifica una proteína con actividad glicosiltransferasa que permite la producción de exopolisacáridos (EPS) y porque está constituida por una de las secuencias de nucleótidos seleccionada entre:
- 5
- a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO9 o un fragmento de la misma; y
 - b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a).
- 2.- Secuencia de DNA GTF según la reivindicación 1 caracterizada porque es la SEQ ID NO9.
- 10 3.- Vector de expresión GTF caracterizado porque comprende la secuencia de DNA GTF según las reivindicaciones 1 y 2.
- 4.- Vector de expresión GTF según la reivindicación 3 caracterizado porque es el plásmido pGTF
- 5.- Uso de la secuencia de DNA GTF según las reivindicaciones 1 y 2 o del vector de expresión GTF según las reivindicaciones 3 y 4 en un proceso de transformación celular.
- 15 6.- Proteína con actividad glicosiltransferasa caracterizada porque está constituida por una de las secuencias de aminoácidos seleccionada entre:
- a) la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO6 o un fragmento de la misma; y
 - b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia definida en a).
- 20 7.- Célula GTF caracterizada porque comprende una secuencia de DNA GTF según las reivindicaciones 1 y 2 o un vector de expresión pGTF según una de las reivindicaciones 3 y 4, capaz de expresar de forma recombinante la proteína GTF según la reivindicación 6 y, por lo tanto, adquiere la capacidad, o mejora la ya existente, de producir EPSs.
- 8.- Uso de las células GTF según la reivindicación 7 en un procedimiento para producir EPSs .
- 25 9.- Uso de las células GTF según la reivindicación 8 caracterizado porque el procedimiento comprende:
- a) el crecimiento de la célula GTF en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión del vector de expresión GTF o de la secuencia de DNA GTF,
 - b) la producción de EPSs por la célula GTF, y
 - c) la purificación de los EPSs de b).
- 30 10.- Uso de las células GTF según la reivindicación 7 en procesos de fermentación de alimentos.

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

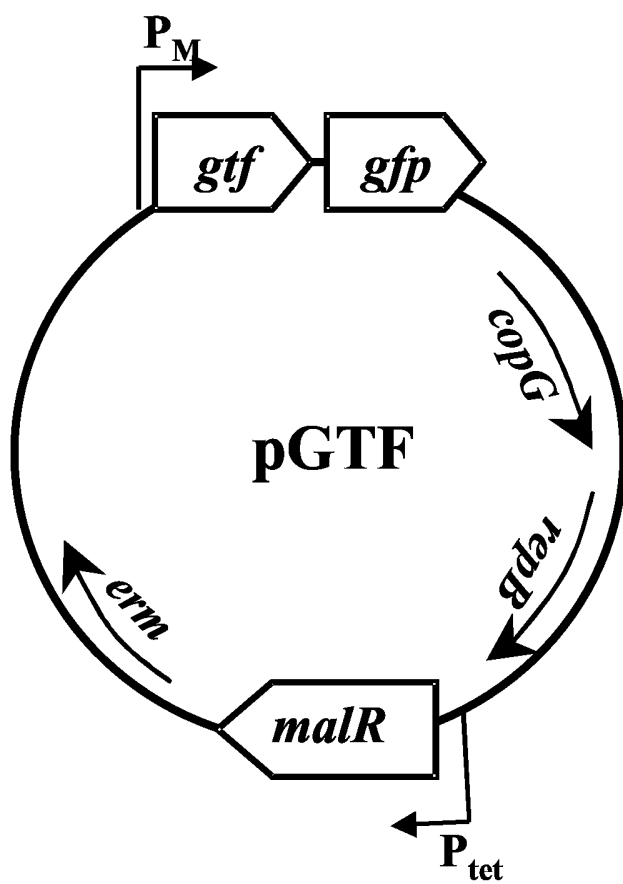


Figura 1

2/3

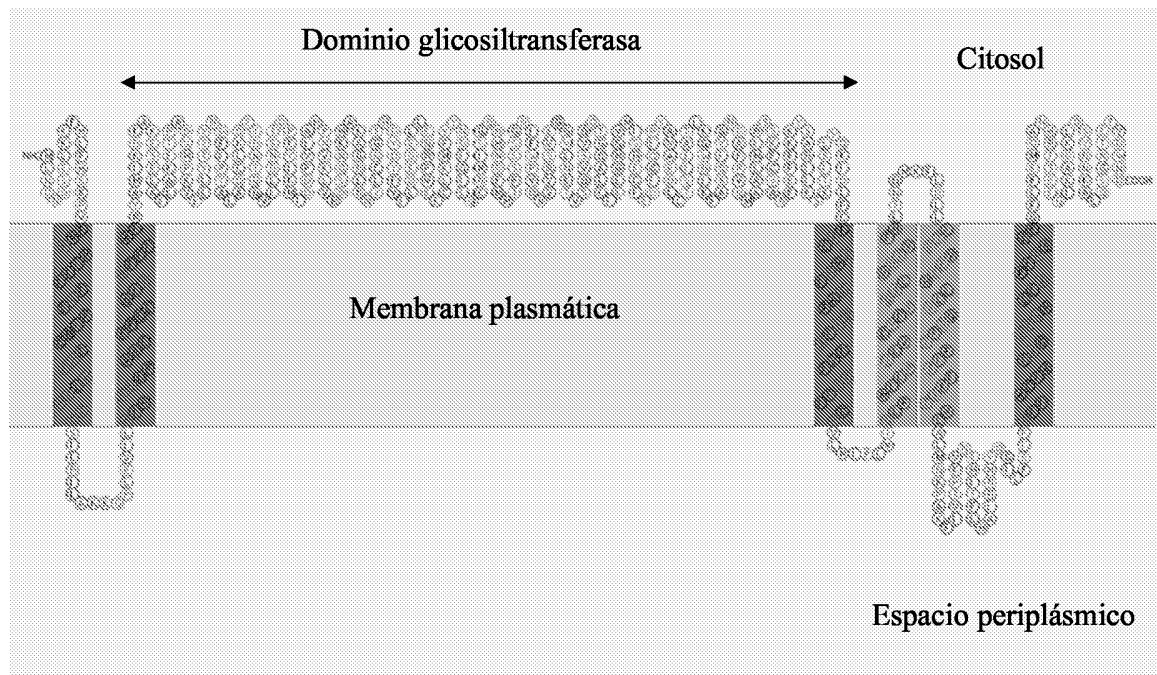


Figura 2

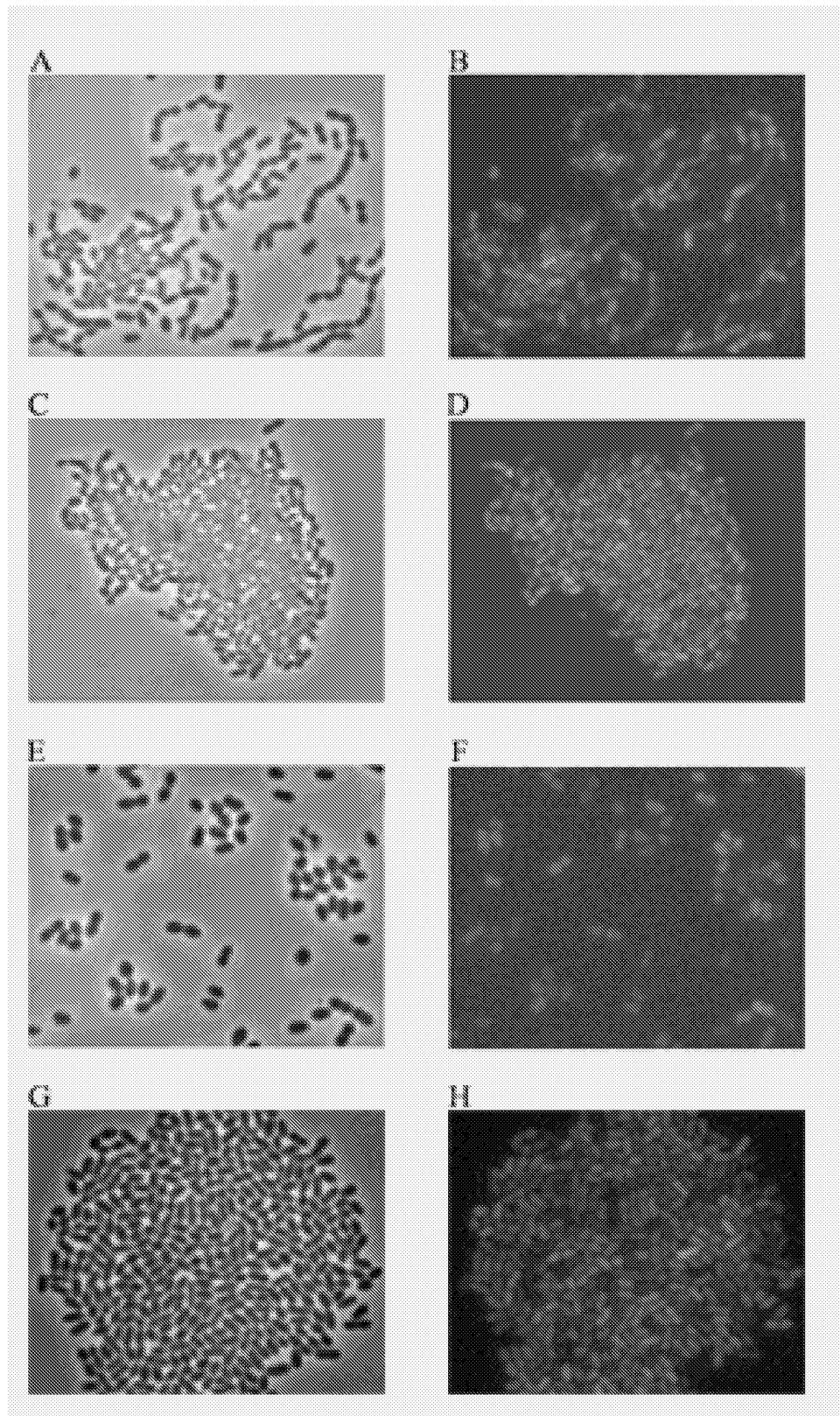


Figura 3

SEQUENCE LISTING

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

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 5 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Oligo IV

 10 <400> 4
 tgtgtaatgg cactcagcagc 20

 <210> 5
 15 <211> 3352
 <212> DNA
 <213> *Pediococcus damnosus*

 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1282)..(2982)

 <400> 5
 25 tgacaacacg caggaagttt taagaagagc ctttcctaac ggtaatttta atgaattacc 60
 aatgattaaa caggaacaag cctatacagc cgtgatgtac tatgatcctg ttttaaagcc 120
 atgtcaggct gaaacaattg aacagtggca agcaaatcca ccacaggtgt tcggtccccc 180
 30 agaacatcaa caaggactag cttatattatc ggggcagctt agcttagatc agttagaaaa 240
 tcatcactta caacggggtt taaagcatga tggcactaaa caactctttt ttggcgaatg 300
 35 caaagccgat ccgacgatta agaacagtca gatcgagaaa atccaaaagc agttaaagc 360
 gcaacaagcc aaggacgacc agtatagaaa agtaaatatt ggacattatc aaccgctaaa 420
 ttacaagcca gttagtccaa gctaccactt aaagacggcc tttagtaacg caatcatgac 480
 40 cgcctatat gcccgatgatg aagattacga acggcaaaaa caggcgcaag gtttaaagga 540
 gactgagtgg gaaatgacga aaaagcaacg gcaacaccaa actcgaaacc ggcatgaaga 600
 45 tgggggcatg cacttgtaat ctaaagttaa aattaaaagt gcaccaacgt gtcatttaa 660
 tggtaaatg aaccataat atagggaaag gagtattcac atgtgacaaa gaaacaggaa 720
 tggtttagct tagctcaagc tagtctcaag cttgaacgag gtagtacgta cgtgagtgtt 780
 50 tggtaagac ggcaccctaa cgagttgcca agtgaaatgc tcatggaaac gggcaaagtt 840
 aaattaatat ctgaagatgg cattgaatgg attaaaaacc acataaaaaa agagggcgtc 900
 55 ctcgtaagca gtgaagttgc taacggggat cagcacctgg aagttacgat tctaggtgtc 960
 accctcctaa caatccattt taccggcggg gttaggggaa agctagtgga tcctaattgt 1020
 60 tcaaaaaaca gcgaaaagac aaacgacgcg atactgccgc aaaactcagc cattgttttc 1080

	taaggattaa	gtcttttggga	ttttgtgtat	ctatcaactc	cttaaagcct	tctgagtcct	1140
	ataataacc	aaaagtgatc	tataaaatgc	tctacgtcga	tttaccgttg	accgatagtt	1200
5	gaatagctca	cggttagcta	aaatatcgtt	aatgaaaaa	tggaatattt	tatggaaaaa	1260
	aattaaagga	atgtagtata	a atg tta	aat gat	aat gat	tca gaa	cta aaa
			Met Leu	Asn Asp	Asn Asp	Ser Glu	Leu Lys
			1		5		10
10	aaa ttt	cac ttg	ttt cat	tct aaa	cca gtc	ttt gta	cca gtt
	Lys Phe	His Leu	Phe His	Ser Lys	Pro Val	Phe Val	Pro Val
			15		20		25
15	att att	tgg ttg	ttt att	atg tgc	tta tat	gaa tat	tta aca
	Ile Ile	Trp Leu	Phe Ile	Met Cys	Leu Tyr	Glu Tyr	Leu Thr
			30		35		40
	gat agc	ata ctt	cct att	tta gct	aaa aag	caa cca	cta gaa
	Asp Ser	Ile Leu	Pro Ile	Leu Ala	Lys Lys	Gln Pro	Leu Glu
			45		50		55
20	tta cct	ata ttc	aat caa	tta ttt	gtg gca	ctt ttc	ttt ttg
	Leu Pro	Ile Phe	Asn Gln	Leu Phe	Val Ala	Leu Phe	Phe Leu
			60		65		70
25	ata act	aat att	att atc	gct atc	cgc tat	gca atg	att aaa
	Ile Thr	Asn Ile	Ile Ile	Ala Ile	Arg Tyr	Ala Met	Ile Lys
			75		80		85
30	gca aaa	gaa tcc	gaa cta	gca ata	ctc gca	aaa gaa	acg cct
	Ala Lys	Glu Ser	Glu Leu	Ala Ala	Ile Leu	Ala Lys	Glu Thr
			95		100		105
35	tgg cac	cct aaa	gtt gag	tta ttg	tat acg	acc tat	aat gat
	Trp His	Pro Lys	Val Glu	Leu Leu	Tyr Thr	Thr Tyr	Asn Asp
			110		115		120
40	cct tat	gca cta	gct caa	tgt tta	aaa cag	aca tat	gat aac
	Pro Tyr	Ala Leu	Ala Gln	Cys Leu	Lys Gln	Thr Tyr	Asp Asn
			125		130		135
45	ggc gtt	att ttg	gat aac	tct aca	gac ccc	aaa tac	atc aag
	Gly Val	Ile Leu	Asp Asn	Ser Thr	Asp Pro	Lys Tyr	Ile Lys
			140		145		150
50	gat gat	ttt gtg	ata gcc	cat cct	aat gta	aag tta	gtc aga
	Asp Asp	Phe Val	Ile Ala	His Pro	Asn Val	Lys Leu	Val Arg
			155		160		165
55	caa aac	aag cat	gct aaa	gct gga	aac tta	aac aat	tat ttg
	Gln Asn	Lys His	Ala Lys	Ala Ala	Gly Asn	Leu Asn	Asn Tyr
			175		180		185
60	ggc act	cat gac	tac gat	tac ttt	gtt atc	cta gat	agc gat
	Gly Thr	His Asp	Tyr Asp	Tyr Phe	Val Ile	Leu Asp	Ser Asp
			190		195		200
	tta gaa	aat aga	ttt gta	gaa aaa	tgt tta	aag atg	ttt tat
	Leu Glu	Asn Arg	Phe Val	Glu Lys	Cys Leu	Lys Met	Phe Tyr
							Tyr Tyr
							Asn
60							1935

	205	210	215	
5	gat att ggc att ctt cag tgt aat cac att agt gga caa aac cac aat Asp Ile Gly Ile Leu Gln Cys Asn His Ile Ser Gly Gln Asn His Asn 220 225 230			1983
10	tcg ttt atg cgt act ttc tct agt tct ggc aat att ttt tgg cca gtg Ser Phe Met Arg Thr Phe Ser Ser Ser Gly Asn Ile Phe Trp Pro Val 235 240 245 250			2031
15	caa aac gtt gta cga agc gtt gaa ggt ggc tgg tta aat aaa act gtg Gln Asn Val Val Arg Ser Val Glu Gly Gly Trp Leu Asn Lys Thr Val 255 260 265			2079
20	tct ggc gtt tct gta ggc caa act gga ggt gca tta tgt att gaa tta Ser Gly Val Ser Val Gly Gln Thr Gly Gly Ala Leu Cys Ile Glu Leu 270 275 280			2127
25	ggt cat ggc gtc atg att tca cgt gaa tgc ttt gaa gat att gga caa Gly His Gly Val Met Ile Ser Arg Glu Cys Phe Glu Asp Ile Gly Gln 285 290 295			2175
30	ata ccc tat gcg gtg gca gaa gac ctt tgt act tct att gaa gct aca Ile Pro Tyr Ala Val Ala Glu Asp Leu Cys Thr Ser Ile Glu Ala Thr 300 305 310			2223
35	cta aaa ggc tgg aac att aaa ttt gct tca caa att tac ggt aat gaa Leu Lys Gly Trp Asn Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ile Tyr Gly Asn Glu 315 320 325 330			2271
40	gcg ttt cct gtt aat atg gca gca tta atg att aga tct agt aag ttt Ala Phe Pro Val Asn Met Ala Ala Leu Met Ile Arg Ser Ser Lys Phe 335 340 345			2319
45	tgt tct gca aat ttt gaa ttt ttt aaa aaa tat tcg gcg aga atc atc Cys Ser Ala Asn Phe Glu Phe Phe Lys Lys Tyr Ser Ala Arg Ile Ile 350 355 360			2367
50	aag tca aag acc ata agt ctc tat caa aaa atc gac ttg ttt tgt ttt Lys Ser Lys Thr Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Leu Phe Cys Phe 365 370 375			2415
55	acc cta tca gtt cca ata agt gct ttt caa tat att agc tta gtt att Thr Leu Ser Val Pro Ile Ser Ala Phe Gln Tyr Ile Ser Leu Val Ile 380 385 390			2463
60	act agt ata att tgt cca gtg ttg cac att cca cta gta aca caa tta Thr Ser Ile Ile Cys Pro Val Leu His Ile Pro Leu Val Thr Gln Leu 395 400 405 410			2511
65	ttt atg tta tta cca acg tta gtc tgt tac ttt agt caa agt ttg gtc Phe Met Leu Leu Pro Thr Leu Val Cys Tyr Phe Ser Gln Ser Leu Val 415 420 425			2559
70	gat act gtc ttt cat ttg aca aac ggt atg aaa ttc tta gat tta ttg Asp Thr Val Phe His Leu Thr Asn Gly Met Lys Phe Leu Asp Leu Leu 430 435 440			2607
75	att tat gaa gta gaa tca atg ttg tta tat ggg tct ttt tat ttt att Ile Tyr Glu Val Glu Ser Met Leu Leu Tyr Gly Ser Phe Tyr Phe Ile 445 450 455 460			2655

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Glu Cys Phe Glu Asp Ile Gly Gln Ile Pro Tyr Ala Val Ala
 290 295 300
 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Glu Met Gln Ala Asn His Arg Thr Ser Glu Glu Gln Ile Lys Ala
 530 535 540
 5

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

10
 Glu Thr Val Asp Trp Asn Asp
 565

15 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

20 <220>
 <223> Oligo V

<400> 7
 25 tctagaaatt aaaggaatgt gtaa 24

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 30 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Oligo VI

35 <400> 8
 tctagattaa tcattccaat caactg 26

<210> 9
 40 <211> 1701
 <212> DNA
 <213> *Pediococcus damnosus*

45 <400> 9
 atgttaaatg ataatgattc agaactaaaa aaatttcact tgtttcattc taaaccagtc 60
 tttgtaccag ttattttaat tatttggttg tttattatgt gcttatatga atatttaaca 120

50 tacacagata gcatacttcc tattttagct aaaaagcaac cactagaagt aattttacct 180
 atattcaatc aattatttgt ggcacttttc ttttgcttg gaataactaa tattattatc 240

55 gctatccgct atgcaatgat taaagacaaa gcaaaagaat ccgaactagc aatactcgca 300
 aaagaaacgc ctgcagactg gcaccctaaa gttgagttat tgtatacgac ctataatgat 360
 tttatacctt atgcactagc tcaatgttta aaacagacat atgataacac gcagggcggtt 420

60 attttggata actctacaga ccccaaatac atcaagatga ttgatgattt tgtgatagcc 480

catcctaatag taaagttagt cagagattct caaaacaagc atgctaaagc tggaaactta 540
 5 aacaattatt tgtgtaatgg cactcatgac tacgattact ttgttatcct agatagcgat 600
 gaattattag aaaatagatt tgtagaaaaa tgttttaaaga tgttttatta caatgatatt 660
 ggcattcttc agtgtaatca cattagtgga caaaaccaca attcgtttat gcgtactttc 720
 10 tctagttctg gcaatatttt ttggccagtg caaaacgttg tacgaagcgt tgaaggtggc 780
 tggttaaata aaactgtgtc tggcgtttct gtaggcaaaa ctggagggtgc attatgtatt 840
 15 gaattaggtc atggcgatc gatttcaogt gaatgctttg aagatattgg acaaatacc 900
 tatgcggtgg cagaagacct ttgtacttct attgaagcta cactaaaagg ctggaacatt 960

 20 aaatttgctt cacaaattta cggtaatgaa gcgtttctctg ttaatatggc agcattaatg 1020
 attagatcta gtaagttttg ttctgcaaat tttgaatttt ttaaaaaata ttcggcgaga 1080
 atcatcaagt caaagaccat aagtctctat caaaaaatcg acttgttttg tttacccta 1140
 25 tcagttccaa taagtgcttt tcaatatatt agcttagtta ttactagtat aatttgccta 1200
 gtgttgcaaca ttccactagt aacacaatta tttatgttat taccaacgtt agtctgttac 1260
 30 tttagtcaaa gtttggtcga tactgtcttt catttgacaa acggtatgaa attcttagat 1320
 ttattgattt atgaagtaga atcaatggtt ttatatgggt ctttttattt tattacaatc 1380
 aagtctaccg tactagcttt aatgaacaaa cctgctaaat tcatagttac accgaaggtt 1440
 35 aatgagcata taacttttct gcatgcaata agaaatcatt atcaaggaat cttattttca 1500
 atatttaca taattgcatg tatcgcaatt tctggaagtt attgggtatt attatcatt 1560
 40 attccgggtt gttttgggtt tttgttogaa atgcaagcta atcatcggac atcagaagaa 1620
 caaataaaaag cggataaatt acagagttac aacaataagg cattacaatc tggcaacacg 1680
 gaaacagttg attggaatga t 1701
 45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2005/070127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 9/10 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de <i>Pediococcus damnosus</i> isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. Lait. Enero-abril 2001, Vol. 81, N° 1-2, pages 289-300. ISSN 0023-7302.	1-9
A		10, 11
A	MARTENSSON, O., STAAF, M., DUEÑAS-CHASCO, M. et al. A fermented, ropy, non-dairy oat product based on the exopolysaccharide-producing strain <i>Pediococcus damnosus</i> . Advances in Food Sciences. 2002, Vol. 24, N°1, pages 4-11. ISSN 1431-7737.	8-11
A	MARTENSSON, O., HASKA, L., DUEÑAS-CHASCO, M., et al. Development of an oat-based sour milk-like product. Advances in Food Sciences. 2003, Vol. 25, N°3, pages 100-106. ISSN 1431-7737.	8-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 December 2005 (16/12/2005)		Date of mailing of the international search report 22 December 2005 (22/12/2005)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Facsimile No. N° de fax 34 91 3495304		Authorized officer E. Relaño Reyes Telephone No. 34 91 3493047

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 2005/070127

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/10 (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N

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

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°	
X	WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de <i>Pediococcus damnosus</i> isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. Lait. Enero-abril 2001, Vol. 81, N° 1-2, páginas 289-300. ISSN 0023-7302.	1-9	
A		10, 11	
A		MARTENSSON, O., STAAF, M., DUEÑAS-CHASCO, M. et al. A fermented, ropy, non-dairy oat product based on the exopolysaccharide-producing strain <i>Pediococcus damnosus</i> . Advances in Food Sciences. 2002, Vol. 24, N°1, páginas 4-11. ISSN 1431-7737.	8-11
A		MARTENSSON, O., HASKA, L., DUEÑAS-CHASCO, M., et al. Development of an oat-based sour milk-like product. Advances in Food Sciences. 2003, Vol. 25, N°3, páginas 100-106. ISSN 1431-7737.	8-11

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"I"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

16 Diciembre 2005 (16.12.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

22 DICIEMBRE 2005 (22.12.2005)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

N° de teléfono + 34 91 3493047