



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 977**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C07K 14/39 (2006.01)

C07K 16/14 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12G 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96914819 .6**

96 Fecha de presentación : **17.05.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0827541**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.1998**

54

Título: **Secuencia de ácido nucleico para una malato permeasa de *S. pompe* y sus usos.**

30

Prioridad: **18.05.1995 ZA 95/4072**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2010

73

Titular/es: **University of Stellenbosch
Victoria Street
7600 Stellenbosch, ZA
University of Guelph**

72

Inventor/es: **Grobler, Jandre;
Krizus, Aldis;
Osothsilp-de-Eknamakul, Chuanpit;
Pretorius, Isak, S.;
Jansen van Vuuren, Hendrick, J. y
Subden, Ronald, E.**

74

Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 336 977 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

Secuencia de ácido nucleico para una malato permeasa de *S. pombe* y sus usos.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un procedimiento y a una secuencia de nucleótidos para la transformación de microorganismos. Más particularmente, la invención se refiere a una molécula de ADN recombinante, a un gen, a un polipéptido, a una cepa de levadura transformada, a un procedimiento de transformación de una cepa de levadura, a un procedimiento de producción de un polipéptido deseado, y a un procedimiento de fermentación.

Antecedentes de la invención

El transporte de ácido L-málico a través de la membrana plasmática y su degradación en microorganismos es de interés considerable en muchos campos, particularmente aquellos que implican la fermentación por levaduras. El ácido L-málico puede ser usado como única fuente de carbono y energía por las levaduras *Candida sphaerica* (Corte-Real y col., 1989), *Hansenula anomala* (Corte-Real y Leao, 1990) y *Candida utilis* (Cassio y Leao, 1993). La forma disociada del malato es transportada a través de la membrana plasmática por simportes protónicos que son inducibles y están sometidos a la represión de la glucosa. No obstante, en *Zygosaccharomyces bailii* (Rodríguez y Thornton, 1990) y *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) (Sousa y col., 1992), el ácido L-málico sólo se puede metabolizar en presencia de una fuente de carbono asimilable (Osothsilp y Subden, 1986). El ácido málico es transportado de manera activa en la forma disociada mientras que el ácido no disociado entra en la célula por difusión simple (Baranowski y Radler, 1984; Osothsilp y Subden, 1986; Sousa y col., 1992). La inhibición competitiva de las velocidades de captación inicial del ácido L-málico por el ácido succínico, el ácido D-málico, ácido fumárico, ácido oxaloacético, ácido α -cetoglutárico, ácido maleico y ácido malónico sugiere fuertemente que estos ácidos son transportados por el mismo transportador en *S. pombe* (Sousa y col., 1992).

La degradación del ácido mélico es de interés particular para las bodegas. Las cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) del vino no pueden metabolizar eficazmente el malato en el mosto de la uva y los cambios en la acidez total del vino durante la vinificación son, por tanto, insignificantes (Gao, 1995). La producción de vinos equilibrados requiere la reducción controlada del ácido málico en exceso, particularmente en las regiones viticultoras del mundo más frías.

Se ha usado la desacidificación química para reducir la acidez total del vino. La desacidificación química normalmente se lleva a cabo mediante (a) mejora - que esencialmente es la dilución del ácido málico con agua azucarada; (b) precipitación - la adición de calcio, potasio u otros cationes para producir una sal insoluble; o (c) enmascaramiento - la adición de zumo de uva o sacarosa al vino finalizado para enmascarar el sabor agrio del ácido málico. Todos estos procedimientos dan como resultado malato residual que puede ayudar a la fermentación maloláctica por bacterias contaminantes, a menos que se trate con dosis elevadas de sulfitos.

Los procedimientos de fermentación maloláctica para la degradación del ácido málico dependen de la conversión del ácido L-málico en ácido L-láctico y CO₂ por bacterias malolácticas, por ejemplo, especies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, y *Pediococcus*. Las bacterias malolácticas pueden encontrarse sobre las uvas que se convierten en parte de la microflora del lagar, o se pueden introducir en el vino cultivos congelados o crio-desechados disponibles comercialmente de las bacterias. Los procedimientos de fermentación malolácticos presentan una serie de desventajas; por ejemplo, las bacterias malolácticas fermentan los terpenos que cambian el carácter del vino. El control de las fermentaciones malolácticas a menudo es difícil, que da como resultado una fermentación maloláctica incompleta y fermentaciones posteriores en botella. Normalmente el crecimiento bacteriano también está acompañado por la producción de dióxido de carbono que puede dar como resultado un vino "gaseoso".

También se han usado cepas de levadura que pueden degradar el ácido L-málico en fermentaciones del vino. Se han intentado fermentaciones que usan la levadura de fisión *S. pombe* que degrada completamente el malato en etanol mediante una fermentación malo-etanólica. Thornton (patente de EE.UU. N° 4.830.968) describe un procedimiento que supone la inoculación de zumo de uva con una cepa de *Saccharomyces malidevorans* que es capaz de degradar parcialmente el ácido L-málico en condiciones de elaboración del vino. No obstante, estas cepas de levaduras (es decir, *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces malidevorans*) no son deseables en la preparación del vino, puesto que se producen sabores desagradables. También se han usado suspensiones celulares de alta densidad de diversas levaduras, incluyendo *S. cerevisiae*, para intentar incrementar la velocidad a la que se degrada el L-malato durante la fermentación (Gao, 1995).

Se han llevado a cabo intentos para hibridar levaduras del vino con cepas de levaduras que metabolizan el malato. La fusión de protoplastos (Carrau y col., 1982; Svoboda, 1980, patente de EE.UU. N° 5.330.774 de Carrau y col.), la transformación (Lautensach y Subden, 1984; Williams y col., 1984), y otros medios (Fernandez, 1967; Goto y col., 1978; Kuczynski y Radler, 1982) no han tenido éxito.

Se ha explorado el tratamiento por ingeniería metabólica de cepas de *S. cerevisiae* para llevar a cabo simultáneamente la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica o malo-etanólica. El gen maloláctico (*mleS*) de *Lactobacillus delbrueckii* (Williams y col., 1984) y *Lactococcus lactis* (Ansanay y col., 1993, Denayrolles y col.,

1994) ha sido clonado, caracterizado y se han realizado varios intentos para introducir y expresar este gen en *S. cerevisiae*. No obstante, las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que expresan el gen *mleS* eran incapaces de degradar eficazmente el malato a L-lactato (Williams y col., 1984; Ansanay y col., 1993, Denayrolles y col., 1995).

5 J.C. van Slooten y col. describen en MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1992, 5, 179-186 una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de un gen *dctA* de una especie de *Rhizobium*. Se considera que el gen *dctA* codifica un gen de la proteína transportadora *dctA* que está involucrada en el sistema de transporte del dicarboxilato; resultó ser un análogo u homólogo de una malato permeasa eucariota.

10 C. Buser-Suter y col. describen en PLANT PHYSIOL: (1982) 69, 456-459 la presencia de una ácido málico permeasa en vacuolas de plantas aisladas de *Bryophyllum daigremontianum*.

MJ Sousa y col. examinan en YEAST 1992, 8, 1025-1031 el transporte de ácido málico en *S. pombe* y describen la evidencia de un simporte protón-dicarboxilato.

15 Viljoen M. y col. describen en YEAST 1994, 10, 613-624 un análisis molecular del gen de la enzima málica (*mae2*) de *S. pombe*.

20 Osothsilp C. y col. describen en JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1986, 168, 1439-1443 el transporte de malato en *S. pombe*.

Roson CW y col. describen en JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1984, 160, 903-909 la clonación molecular y la organización genética de genes transportadores *dct* de *Rhizobium*.

25 Ortiz y col. enseñan en EMBO JOURNAL 1992, 11, 3491-3499 que la tolerancia a metales pesados en levaduras de fisión requiere un transportador de membrana vacuolar de tipo cassette de unión a ATP y describen la complementación de la clonación de un transportador de membrana vacuolar procedente de *S. pombe*.

30 Así, era un objeto proporcionar una molécula de ácidos nucleicos que codificase una proteína que medie en la captación de L-malato, succinato, y malonato en eucariotas.

Resumen de la invención

35 Los presentes inventores han identificado un gen en *S. pombe*, designado gen *mae1* o gen de la malato permeasa, que codifica una permeasa de un ácido dicarboxílico (denominada en el presente documento como “malato permeasa” o “Mae1”). Esta es la primera caracterización molecular de una permeasa de un ácido dicarboxílico en una célula eucariota. El gen *mae1* de *S. pombe* codifica un único ARNm de 1,5 kb. El gen se expresa constitutivamente y no está sometido a represión catabólica como se ha informado previamente para el gen de la malato permeasa de *C. utilis* (Cassio y Leas, 1993) y *H. anomala* (Corte-Real y Leao, 1990). El gen *mae1* fue mapeado a 2842 pb en 5' del gen *MFm1* sobre el cromosoma I.

45 Los ensayos de transporte revelaron que el gen *mae1* codifica una malato permeasa involucrada en el transporte de L-malato, succinato, y malonato. La malato permeasa de *S. pombe* tiene 435 residuos aminoácidos con un peso molecular de 49 kDa aproximadamente.

50 La Mae1 de *S. pombe* contiene una serie de regiones bien caracterizadas que incluyen dos sitios de fosforilación de la proteína quinasa C, una región PEST, una región de cremallera de leucinas, dos regiones enlazadoras hidrófilas, y diez hélices que se extienden a través de la membrana. En particular, se encontró una región PEST bien conservada (aminoácidos 421-434 en la Figura 3, SEQ ID NO: 2) en el extremo C-terminal, que consta de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T) y en un menor grado ácido aspártico. Un motivo de cremallera de leucinas (aminoácidos 214 a 235 en la Figura 3, SEQ ID NO: 2), que consta de cuatro residuos de leucina espaciados por 6 aminoácidos, está localizado entre los dominios seis y siete que se extienden a través de la membrana. Se encontraron sitios de fosforilación de la proteína quinasa C en la posición 28: phvplSqrk y en la posición 94: ikypsTikdsw. La Mae1 de *S. pombe* también contiene tres sitios potenciales de glicosilación unidos a N localizados en los aminoácidos 193, 277 y 336 (Figura 3, SEQ ID NO: 2).

60 Los presentes inventores han introducido una ruta eficiente para la degradación de malato en *S. cerevisiae* clonando y expresando los genes de la malato permeasa (*mae1*) y de la enzima málica (*mae2*) de *S. pombe* en esta levadura. Las cepas recombinantes degradaron eficazmente 8 g/l de malato en 7 días. Una cepa recombinante de *S. cerevisiae* que contiene tanto los genes *mae1* de *S. pombe* como *mleS* de *L. lactis* también demostró degradar eficaz y rápidamente el L-malato a L-lactato en mosto de uva en un periodo de tiempo significativamente corto. Los presentes inventores han demostrado la eficacia de estas cepas recombinantes (*mae1*, *mae2*, y *mae1mleS*) para la fermentación maloetanólica, y la fermentación maloláctica, respectivamente.

65 Por tanto, la presente invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que media en la captación de L-malato, succinato, y malonato. La molécula de ácidos nucleicos puede comprender el gen de la malato permeasa (*mae1*) de *S. pombe*. En particular, la molécula de

ES 2 336 977 T3

ácidos nucleicos se caracteriza por la codificación de una proteína que media en la captación de L-malato, succinato, y malonato y tiene una región PEST, y un motivo de cremallera de leucinas.

En una forma de realización de la invención, la molécula de ácidos nucleicos aislada comprende

(i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o en la Figura 3;

(ii) secuencias de ácidos nucleicos complementarias a (i); y

(iii) un ácido nucleico capaz de hibridarse en condiciones rigurosas a un ácido nucleico de (i).

Preferentemente, la molécula de ácidos nucleicos aislada comprende

(i) una secuencia de ácidos nucleicos como la mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la Figura 3, en la que T también puede ser U;

(ii) secuencias de ácidos nucleicos complementarias a (i), preferentemente complementarias a la secuencia de ácidos nucleicos de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la Figura 3;

(iii) un ácido nucleico capaz de hibridarse en condiciones rigurosas a un ácido nucleico de (i); y

(iv) una molécula de ácidos nucleicos que difiere de cualquiera de los ácidos nucleicos de (i) a (iii) en las secuencias de los codones debido a la degeneración del código genético.

La invención también contempla una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica un truncamiento de Mae1, un análogo, o un homólogo de Mae1, o uno de sus truncamientos. (Mae1 y los truncamientos, análogos y homólogos de Mae1 también se denominan colectivamente en el presente documento “proteína Mae1” o “proteínas Mae1”).

La invención también proporciona una molécula nucleica que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína Mae1 y una proteína o péptido heterólogo, preferentemente un marcador seleccionable, o una proteína involucrada en el metabolismo del L-malato, succinato, o malonato, tal como la enzima málica o la enzima maloláctica.

Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se pueden insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Por consiguiente, se pueden construir vectores de expresión adaptados para la transformación de una célula hospedadora que comprende una molécula de ácidos nucleicos de la invención y uno o más elementos de transcripción y traducción unidos de manera operativa a la molécula de ácidos nucleicos.

El vector de expresión se puede usar para preparar células hospedadoras transformadas que expresan una proteína Mae1. Por tanto, la invención proporciona adicionalmente células hospedadoras que contienen un vector de expresión de la invención.

De acuerdo con una forma de realización de la invención, se proporciona una cepa de levadura que incorpora un material de ADN que comprende:

una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido funcional o uno de sus intermedios, o codifica al menos en gran parte su secuencia de aminoácidos que proporcionarán actividad malato permeasa para una aplicación en la que la malato permeasa esté prevista para su uso,

un promotor para la promoción de la transcripción de la secuencia de nucleótidos y la conducción de la expresión de la malato permeasa, y

un terminador para la terminación de la transcripción de la secuencia de nucleótidos.

La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para la preparación de una proteína Mae1 utilizando las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas de la invención. En una forma de realización se proporciona un procedimiento para la preparación de una proteína Mae1 que comprende (a) la transferencia de un vector de expresión recombinante de la invención a una célula hospedadora; (b) la selección de las células hospedadoras transformadas entre células hospedadoras no transformadas; (c) el cultivo de una célula hospedadora transformada seleccionada en condiciones que permitan la expresión de la proteína Mae1; y (d) el aislamiento de la proteína Mae1.

Según una forma de realización de la invención, se proporciona un procedimiento de producción de malato permeasa, que incluye el cultivo de una cepa de levaduras transformadas mediante material de ADN que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una malato permeasa funcional o uno de sus intermedios, o codifica al menos

en gran parte su secuencia de aminoácidos que proporcionarán actividad malato permeasa para una aplicación en la que la malato permeasa esté prevista para su uso, y que adicionalmente codifica un promotor para la promoción de la transcripción de la secuencia de nucleótidos y la conducción de la expresión de la malato permeasa, y un terminador para la terminación de la transcripción de la secuencia de nucleótidos.

5

Además, la invención contempla de manera general una proteína Mae1 aislada que media en la captación de L-malato, succinato, y malonato. En una forma de realización, la proteína se caracteriza porque tiene parte o toda la conformación estructural primaria (es decir, secuencia continua de residuos aminoácidos) y la actividad enzimática de Mae1 procedente de *S. pombe*. En particular, se proporciona una proteína Mae1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o en la Figura 3. La invención también incluye truncamientos de la proteína y análogos, homólogos, e isoformas de la proteína y sus truncamientos (es decir, proteínas Mae1).

10

Las proteínas Mae1 de la invención se pueden conjugar con otras moléculas, tales como péptidos o proteínas, para preparar proteínas de fusión. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la síntesis de proteínas de fusión N-terminales o C-terminales.

15

La invención contempla adicionalmente anticuerpos que tengan especificidad contra un epítipo de una proteína Mae1 de la invención. Los anticuerpos se pueden marcar con una sustancia detectable y se pueden usar para detectar proteínas Mae1.

20

La invención también permite la construcción de sondas de nucleótidos que sean únicas para las moléculas de ácidos nucleicos de la invención y, por consiguiente, para las proteínas Mae1. Por tanto, la invención también se refiere a una sonda que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1. La sonda puede estar marcada, por ejemplo, con una sustancia detectable y se puede usar para seleccionar, entre una mezcla de secuencias de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que presenta una o más de las propiedades de la Mae1.

25

La identificación y secuenciación de un gen responsable del transporte activo del L-malato, succinato, y malonato permite a alguien experto en la materia mediar en la captación en células de malato, succinato y malonato en diversas aplicaciones tecnológicas.

30

Se puede usar una proteína Mae1 de la invención para identificar sustancias que afectan a la actividad de la proteína, y así pueden ser útiles en la mediación del transporte de L-malato, succinato, o malonato en una célula, preferentemente un microorganismo o la célula de una planta. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para la identificación de una sustancia que media en el transporte de L-malato, succinato o malonato que comprende la incubación de una proteína Mae1 de la invención con un sustrato de la proteína Mae1, y una sustancia de prueba que se sospecha que afecta a la actividad de la proteína Mae1, y la determinación del efecto de la sustancia comparándola con un control.

35

La invención también se refiere a un procedimiento para dotar a una célula, preferentemente un microorganismo o la célula de una planta, de la capacidad de transportar malato que comprende la transformación de la célula con un fragmento de ADN o una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que media en la captación de malato. Preferentemente, la célula se transforma con una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína Mae1 de la invención. Según una forma de realización específica de la invención, se proporciona un procedimiento para dotar a una cepa de levaduras de la capacidad de transportar eficazmente el malato, dicho procedimiento que comprende la transformación de la cepa de levaduras con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido funcional o uno de sus intermedios, o codifica al menos en gran parte su secuencia de aminoácidos que mediarán en la captación del malato. La transformación de las células puede dotar a las células con la capacidad de degradar eficazmente el malato, succinato, o malonato.

45

Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para mediar en la captación de malato en cepas de levaduras en muchas aplicaciones industriales tales como la elaboración de vino. Por tanto, los procedimientos de la invención se pueden usar para transformar una levadura o levadura del vino del género *Saccharomyces*, preferentemente *Saccharomyces cerevisiae* o *S. bayanus*, para transportar el malato y permitir así que la levadura degrade eficazmente el malato. Más particularmente, la transformación de *S. cerevisiae* se puede llevar a cabo clonando el gen de la malato permeasa (*mae1*) procedente de la levadura *S. pombe* en la cepa de la levadura *S. cerevisiae*.

50

55

La invención proporciona adicionalmente, en general, un procedimiento de degradación del malato que incluye el cultivo, en presencia de una fuente de malato, de un microorganismo que ha sido transformado con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que media en la captación de malato.

60

Más específicamente, según la invención, adicionalmente se proporciona un procedimiento de degradación del malato que incluye el cultivo, en presencia de una fuente de malato, de una cepa de levadura que ha sido transformada introduciendo en la cepa de levadura una molécula de ácidos nucleicos que tiene una secuencia que codifica la malato permeasa o uno de sus intermedios, o codifica al menos en gran parte su secuencia de aminoácidos que mediarán en la captación del malato, y que incluye un promotor y un terminador para la promoción y la terminación de la transcripción, y por tanto de la expresión del gen de la malato permeasa.

65

La invención se extiende, incluso, a un procedimiento de degradación del malato durante la fermentación del vino, cuyo procedimiento incluye, el cultivo, en mostos de uva que contienen una fuente de malato, de una cepa de levadura transformada mediante material de ADN recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una malato permeasa funcional o uno de sus intermedios, o codifica al menos en gran parte su secuencia de aminoácidos que proporcionarán actividad malato permeasa, y que adicionalmente codifica un promotor para la promoción de la transcripción de la secuencia de nucleótidos y la conducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos, y un terminador para terminar la transcripción de la secuencia de nucleótidos que da como resultado una permeasa para transportar el malato al interior de las células de levadura.

Así, según la invención se proporciona un procedimiento de fermentación del vino, que incluye el cultivo, en un medio de fermentación del vino que incluye mosto de uva que contiene una fuente de malato, de una cepa de levadura transformada mediante material de ADN recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una malato permeasa funcional o uno de sus intermedios, o codifica al menos en gran parte su secuencia de aminoácidos que proporcionarán actividad malato permeasa, y que adicionalmente codifica un promotor para la promoción de la transcripción de la secuencia de nucleótidos y la conducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos, y un terminador para terminar la transcripción de la secuencia de nucleótidos, que da como resultado una permeasa para transportar el malato al interior de las células de levaduras.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. No obstante, se debe entender que aunque la descripción detallada y los ejemplos específicos indican formas de realización preferidas de la invención, se proporcionan sólo a modo de ilustración, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y del alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

25 Descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor con referencia a los dibujos en los que:

La Figura 1 muestra la transferencia cromosómica del gen *mae1* en el que los cromosomas de *S. pombe* se separaron sobre un gel CHEF (izquierda) y se probaron con una sonda con un fragmento Nsi1/Xho1 interno marcado de *mae1* (derecha);

la Figura 2 muestra un mapa de restricción y la estrategia de secuenciación del ADN para la región codificante y la región 3' del gen *mae1* y del gen *MFm1*;

la Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen *mae1*, los nucleótidos que están numerados a la izquierda y los aminoácidos, designados por el código estándar de una sola letra, que están numerados a la derecha;

la Figura 4 muestra una gráfica de hidropatía de la proteína *mae1* predicha;

la Figura 5 es un modelo sugerido que muestra la distribución propuesta de los dominios de la membrana hidrófoba que están numerados del 1 al 10;

la Figura 6 muestra una transferencia de Northern del ARN total de *S. pombe* de tipo silvestre, probada con una sonda con el fragmento Nsi1/Xho1 de 695 pb de *mae1*;

la Figura 7 muestra la captación de (a) [¹⁴C] ácido L-málico y (b) [¹⁴C] ácido succínico por el tipo silvestre (Δ), el mutante *mae1* (○) y el mutante complementado (□);

la Figura 8 muestra una descripción general de la permeabilidad y el transporte y degradación del malato por (A) *S. cerevisiae* y (B) *S. pombe*;

la Figura 9 muestra la captación de ¹⁴C L-malato por cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contienen el gen *mae1* de *S. pombe* bajo la regulación de (A) el promotor de PGK1 y (B) el promotor de ADH1;

la Figura 10 muestra la degradación del malato por las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contienen los genes *mae1* y/o *mae2* de *S. pombe* que contienen 8-9 g/l de L-malato en medio glicerol-etanol al 2%;

la Figura 11 muestra la degradación del malato por las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contiene los genes *mae1* y/o *mae2* de *S. pombe* que contienen 8-9 g/l de L-malato en medio glucosa al 2%;

la Figura 12 muestra la degradación del L-malato en mosto de uva Cabernet Sauvignon por cepas recombinantes de *S. cerevisiae*, incluyendo las cepas control;

la Figura 13 muestra la degradación del L-malato en mosto de uva Chardonnay por cepas recombinantes de *S. cerevisiae*, incluyendo las cepas control;

la Figura 14 son transferencias que muestran la fermentación maloláctica por las cepas de levadura recombinante de *S. cerevisiae* en vinos Cabernet Sauvignon (A) y Chardonnay (B) después de la fermentación; y

la Figura 15 muestra una representación esquemática de la subclonación del ORF de *mae1* de *S. pombe* bajo el control del promotor de PGK1 y las secuencias terminadoras en pHVX2, un derivado de Yeplac181.

Descripción detallada de la invención

I. Moléculas de ácidos nucleicos de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos aislada que tiene una secuencia que codifica una proteína que media en la captación de L-malato, succinato, y malonato. El término "aislado" se refiere a un ácido nucleico sustancialmente exento de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o reactivos químicos, u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Un ácido nucleico "aislado" también está exento de secuencias que flanquean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' de la molécula de ácidos nucleicos) de las cuales deriva el ácido nucleico. El término "ácido nucleico" está previsto que incluya ADN y ARN y puede ser de doble cadena o de cadena sencilla. En una forma de realización preferida, la molécula de ácidos nucleicos codifica Mae1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o en la Figura 3. En otra forma de realización, la molécula de ácidos nucleicos es un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y en la Figura 3.

La invención incluye secuencias de ácidos nucleicos complementarias al ácido nucleico que codifica Mae1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y en la Figura 3, y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y en la Figura 3; preferentemente, las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a la secuencia de ácidos nucleicos de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 1 y en la Figura 3.

La invención también incluye moléculas de ácidos nucleicos que tienen una identidad u homología de secuencia sustancial con la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y en la Figura 3, o que codifican proteínas Mae1 que tienen una homología sustancial con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y en la Figura 3. La homología se refiere a la similitud de secuencia entre secuencias y se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se pueden alinear con el fin de comparar. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base del nucleótido o aminoácido, entonces las moléculas son coincidentes o tienen posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

La invención también incluye una molécula de ácidos nucleicos, y fragmentos de la molécula de ácidos nucleicos que tiene al menos 15 bases, que se hibrida con las moléculas de ácidos nucleicos de la invención en condiciones de hibridación, preferentemente condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación del ADN son conocidas por aquellos expertos en la materia, o se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, se puede emplear lo siguiente: 6,0* cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a 45°C aproximadamente, seguido por un lavado de 2,0 x SSC a 50°C. La rigurosidad se puede seleccionar en base a las condiciones usadas en la etapa de lavado. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado se puede seleccionar a partir de una rigurosidad elevada de 0,2 x SSC a 50°C aproximadamente. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede estar en condiciones de rigurosidad elevada, a 65°C aproximadamente.

Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas y purificadas que tienen secuencias que difieren de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la Figura 3, debido a la degeneración del código genético también están dentro del alcance de la invención.

Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención que comprende ADN se puede aislar preparando una sonda de ácidos nucleicos marcada basada en todas o parte de las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en la Figura 3 o en la SEQ ID NO: 1, y usando esta sonda de ácidos nucleicos marcada para seleccionar una librería de Δ ADN apropiada (por ejemplo, un ADNc o una librería de ADN genómico). Por ejemplo, se puede usar una librería genómica completa aislada de un microorganismo para aislar un ADN que codifica una proteína Mae1 de la invención seleccionando la librería con la sonda marcada usando técnicas habituales. Los ácidos nucleicos aislados mediante selección de un ADNc o una librería de ADN genómico se pueden secuenciar mediante técnicas habituales.

Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención que es ADN también se puede aislar amplificando selectivamente un ácido nucleico que codifica una proteína Mae1 de la invención usando procedimientos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ADNc o ADN genómico. Es posible diseñar cebadores de oligonucleótidos sintéticos a partir de las moléculas de ácidos nucleicos mostradas en la Figura 3 o en la SEQ ID NO: 1, para su uso en PCR. Un ácido nucleico se puede amplificar a partir de ADNc o ADN genómico usando estos cebadores de oligonucleótidos y técnicas de amplificación por PCR habituales. El ácido nucleico amplificado de esta forma se puede clonar en un vector apropiado y se puede caracterizar mediante análisis de la secuencia de ADN. El ADNc se puede preparar a partir de ARNm, aislando el ARNm celular total mediante una variedad de técnicas, por ejemplo, usando el procedimiento de extracción con tiocianato de guanidinio de Chirgwin y col., Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979). A continuación el ADNc se sintetiza a partir del ARNm usando la transcriptasa inversa (por ejemplo,

ES 2 336 977 T3

transcriptasa inversa Moloney MLV disponible en Gibco/BRL, Bethesda, MD, o transcriptasa inversa AMV disponible en Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL).

5 Una molécula de ácidos nucleicos aislada de la invención que sea ARN se puede aislar clonando un ADNc que codifica una nueva proteína Mae1 de la invención en un vector apropiado que permita la transcripción del ADNc para producir una molécula de ARN que codifica una nueva proteína de la invención.

10 Una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína que media en la captación de L-malato, ácido succínico o malonato también se puede identificar usando una aproximación funcional. Por ejemplo, el gen *mae1* en *S. pombe* se puede interrumpir empleando técnicas de ADN recombinante habituales y las secuencias de ADN del gen *mae1* como se ha descrito en el presente documento, o alternativamente, una cepa de *S. pombe* que contiene un gen *mae1* se puede someter a un tratamiento mutágeno, incluyendo radiación o tratamientos químicos. En particular, una cepa de *S. pombe* se puede tratar con etilmetanosulfonato (EMS), ácido nitroso (NA), o hidroxilamina (HA), que producen mutantes con sustituciones de pares de bases. Los mutantes deficientes en la utilización de malato, ácido succínico, 15 o malonato se pueden seleccionar, por ejemplo, cultivando en placa una dilución apropiada sobre placas de agar diferenciales en las que las colonias mutantes son de un color distinguible. Se puede usar la complementación de estos mutantes con librerías genómicas procedentes de otros organismos para identificar clones que contienen genes que codifican proteínas que median en la captación de L-malato, ácido succínico y malonato (véase Ejemplo 1).

20 Una molécula de ácidos nucleicos de la invención también se puede sintetizar químicamente usando técnicas habituales. Se conocen diversos procedimientos de síntesis química de polidesoxinucleótidos, incluyendo síntesis en fase sólida que, al igual que la síntesis peptídica, ha sido completamente automatizada en sintetizadores de ADN disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, Itakura y col. patente de EE.UU. N° 4.598.049; Caruthers y col. patente de EE.UU. N° 4.458.066; e Itakura patentes de EE.UU. N° 4.401.796 y 4.373.071).

25 La determinación de si una molécula de ácidos nucleicos particular codifica una proteína Mae1 de la invención se puede conseguir expresando el ADNc en una célula hospedadora apropiada mediante técnicas habituales, y probando la actividad de la proteína usando los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la actividad de una proteína Mae1 putativa se puede someter a prueba mezclándola con un sustrato apropiado y sometiéndola a ensayo para la actividad malato permeasa. Alguien con conocimientos en la materia también puede comparar la estructura tridimensional de la proteína, analizada, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X o espectroscopia de RMN bidimensional, con la estructura tridimensional para la malato permeasa de *S. pombe*. Un ADNc que tiene la actividad, o la estructura tridimensional de una nueva proteína de la invención aislado de esta forma se puede secuenciar mediante técnicas habituales, tales como la terminación de la cadena con didesoxinucleótidos o secuenciación 35 química de Maxam-Gilbert, para determinar la secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína codificada.

40 El codón de iniciación y las secuencias sin traducir de una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína Mae1 se pueden determinar usando *software* de ordenador disponible actualmente diseñado para este propósito, tal como PC/Gene (IntelliGenetics Inc., CA). Los elementos reguladores se pueden identificar usando técnicas convencionales. La función de los elementos se puede confirmar usando estos elementos para expresar un gen informador que está unido de manera operable a los elementos. Estas construcciones se pueden introducir en células en cultivo usando procedimientos habituales. Además, para identificar elementos reguladores en el ADN, esas construcciones también se pueden usar para identificar proteínas que interactúan con los elementos, usando técnicas conocidas en 45 la materia.

50 La secuencia de una molécula de ácidos nucleicos de la invención también se puede invertir en relación a su presentación normal para su transcripción para producir una molécula de ácidos nucleicos antisentido. Preferentemente, una secuencia antisentido se construye invirtiendo una región que precede al codón de iniciación o a una región sin conservar. En particular, las secuencias de ácidos nucleicos contenidas en las moléculas de ácidos nucleicos de la invención o uno de sus fragmentos, preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en el Listado de secuencias como SEQ ID NO: 1 y en la Figura 3 se pueden invertir en relación a su presentación normal para su transcripción para producir moléculas de ácidos nucleicos antisentido. Las secuencias antisentido se pueden usar para modular la expresión del gen *mae1* reduciendo o inhibiendo de esta forma la captación del L-malato, ácido succínico, o malonato. 55

60 La invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que comprenden una proteína Mae1 de la invención y una proteína o péptido heterólogo, o una proteína marcadora seleccionable (véase a continuación). La construcción de una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión, que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de un péptido o una proteína seleccionada y una secuencia de ácidos nucleicos de una proteína Mae1, emplea técnicas de ingeniería genética convencionales [véase, Sambrook y col., Molecular Cloning. A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. Por ejemplo, la secuencia que codifica una proteína seleccionada se puede fusionar a una secuencia de una de diversas regiones identificables que, cuando la proteína está unida a membrana, se encuentran sobre la superficie de la célula. Además, la proteína seleccionada se puede fusionar al extremo amino de la molécula Mae1. Alternativamente, la 65 secuencia de la proteína seleccionada se puede fusionar al extremo carboxilo de la molécula Mae1. En cualquiera de los dos extremos amino o carboxilo, el péptido o la proteína deseada está fusionada de manera que la fusión no desestabiliza la estructura nativa de ninguna de las proteínas.

Una molécula de ácidos nucleicos de la invención puede contener múltiples copias de una secuencia que codifica una proteína Mae1, con la secuencia que codifica una proteína o un péptido heterólogo fusionada a sólo una de las secuencias Mae1, o con la proteína o el péptido heterólogo fusionado a todas las copias de la secuencia Mae1.

5 Una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1 y una secuencia que codifica una secuencia de una proteína o péptido heterólogo opcionalmente pueden contener un péptido enlazador insertado entre la secuencia Mae1 y la secuencia del péptido o proteína heteróloga seleccionada. Esta secuencia enlazadora puede codificar, si se desea, un polipéptido que sea escindible o digerible de manera seleccionable mediante procedimientos químicos o enzimáticos convencionales. Por ejemplo, el sitio de escisión seleccionado puede ser un sitio de escisión enzimático. La secuencia enlazadora opcional puede servir para un fin distinto a la provisión de un sitio de escisión. El enlazador también puede ser una secuencia de aminoácidos simple de una longitud suficiente para evitar cualquier impedimento estérico entre la molécula Mae1 y el péptido o proteína heteróloga seleccionada.

15 Una amplia variedad de genes heterólogos o fragmentos génicos son útiles en la formación de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención. Los genes heterólogos que se pueden incorporar a las moléculas de ácidos nucleicos de la invención incluyen los siguientes:

(a) genes del ácido maloláctico, que codifican una enzima maloláctica que convierte el L-malato en L-lactato, y truncamientos, análogos y sus homólogos que tienen la actividad de una enzima maloláctica. Ejemplos de genes que codifican una enzima maloláctica son los genes *mleS* y EML de *Lactobacillus lactis* (V. Ansanay, y col., FEBS 332:74-80; SEQ ID NOS: 3 y 5) y *L. delbrueckii* (Williams y col., 1984), y el gen maloláctico descrito por Lautensach, y Subden (Microbios, 1984);

25 (b) los genes del ácido málico que codifican una enzima del ácido málico que cataliza la descarboxilación oxidativa del malato en piruvato y dióxido de carbono seguido por la descarboxilación y reducción sucesiva de acetaldehído para dar etanol, y truncamientos, análogos y sus homólogos que tienen la actividad de una enzima del ácido málico. Los ejemplos de genes del ácido málico incluyen el gen *mae2* de *S. pombe* (Viljoen y col., 1994, SEQ ID NO: 7); y los genes que codifican las enzimas del ácido málico de ratón (Bagchi, S., y col., J. Biol. Chem. 262, 1558-1565, 1987), rata (Mangnuson, Ma. A. y col., J. Biol. Chem. 261, 1183-1186, 1986), *Zea maize* (Rothermel, B. A. y Nelson, T. J. Biol. Chem. 264, 19587-19592, 1989), *P. vulgaris*, (Walter y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5546-5550), *Populus deltoides* (Van Doorselaere y col. 1991, Plant Physiol. 96:1385-1386); *F. linearis* (Rajeevan y col., 1991, Plant Mol. Biol. 17:371-383); *B. stearo* (Kobayshi y col., 1989, J. Biol. Chem. 264: 3200-3205), *E. coli* (Mahajan, S. K. y col., Genetics 125, 261-273, 1990), *Flaveria trinervia* (Boersch, D., y Westhoff, P., FEBS Lett.), humano (Loeber, G., y col., J. Biol. Chem. 266, 3016-3021, 1991), *Ascaris suum* (base de datos Swiss-Prot, número de acceso P27443) y *Mesembryanthemum crystallinum* (Cushman, 1992, Eur. J. Biochem. 208, 259-266); y

(c) genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo del malato en plantas, y truncamientos, análogos y sus homólogos que tienen la actividad de las enzimas. Ejemplos de enzimas involucradas en el metabolismo del malato en plantas incluyen la malato deshidrogenasa, enzima málica, malato sintasa, fumarasa, y PEP carboxilasa (Martinoia, E. y D. Rentsch, Acta. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994, 45:447-67 y las referencias allí presentadas).

II. Proteínas Mae de la invención

45 Como se ha mencionado en el presente documento, la invención contempla una proteína Mae1 aislada que media en la captación de L-malato, succinato, y malonato. En una forma de realización, la proteína se caracteriza porque tiene parte o toda la conformación estructural primaria (es decir, la secuencia continua de residuos aminoácidos) y la actividad enzimática de Mae1 de *S. pombe*.

50 En particular, se proporciona una proteína Mae1 purificada que tiene la secuencia de aminoácidos de Mae1 de *S. pombe* como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y en la Figura 3. El gen *mae1* de *S. pombe* codifica una proteína de 435 residuos aminoácidos con un peso molecular de 49 kDa aproximadamente. El perfil de hidropatía de la secuencia de aminoácidos deducida (Figura 4) reveló una proteína con N- y C-terminos hidrófilos y diez hélices putativas que se extienden a través de la membrana, típicas de proteínas de transporte de membrana. Los 36 aminoácidos N-terminales y los 65 aminoácidos C-terminales son altamente hidrófilos.

60 Se construyó un modelo estructural para la malato permeasa mediante análisis por ordenador (Figura 5). Dos enlazadores hidrófilos prominentes, de 20 y 25 aminoácidos de largo, están localizados entre los dominios hidrófobos que se extienden a través de la membrana dos y tres, y siete y ocho, respectivamente. La longitud de los otros enlazadores hidrófilos abarca entre 7 y 12 aminoácidos.

65 La Mae1 de *S. pombe* contiene una serie de regiones bien caracterizadas que incluyen dos sitios de fosforilación de la proteína quinasa C, una región PEST, una región de cremallera de leucinas, dos regiones enlazadoras hidrófilas, y diez hélices que se extienden a través de la membrana. En particular, en el extremo C-terminal se encuentra una región PEST bien conservada (aminoácidos 421-434), que consta de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T) y en un menor grado ácido aspártico. Un motivo de cremallera de leucinas (aminoácidos 214 a 235), que consta de cuatro residuos de leucina espaciados por 6 aminoácidos, está localizado entre los dominios que se extienden a

través de la membrana seis y siete. Los sitios de fosforilación de la proteína quinasa C se encontraron en la posición 28: phvplSqrkly y en la posición 94: ikypsTikdsw. La Mae1 de *S. pombe* también contiene tres sitios potenciales de glicosilación unidos a N localizados en los aminoácidos 193, 277 y 336.

5 La estructura tridimensional de la malato permeasa de *S. pombe* representada en la Figura 5 muestra que la malato permeasa contiene varias regiones accesibles identificables que, cuando la proteína está unida a membrana, se encuentran sobre la superficie de la célula, y no están involucradas en ninguna de las interacciones con el resto de la proteína que contribuyen a la estabilidad estructural general. Estas regiones son, por tanto, buenos candidatos como sitios para fusiones o modificaciones (inserciones, deleciones, etc.) como se ha descrito en el presente documento. Por tanto, tanto el extremo amino como el extremo carboxilo de la malato permeasa de *S. pombe* están fácilmente accesibles para fusiones o modificaciones.

15 Las proteínas Mae1 de la invención se caracterizan adicionalmente por su capacidad para transportar L-malato, succinato y malonato desde un medio extracelular a la matriz intracelular. El transporte de malato, succinato, y malonato se puede someter a ensayo usando los ensayos de transporte descritos en el presente documento. Por ejemplo, células de levadura transformadas con una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína Mae1 de la invención se pueden crecer en presencia de L-malato o ácido L-succínico marcado y se puede medir la cantidad de L-malato o ácido L-succínico marcado unido a las células de levadura.

20 Dentro del contexto de la presente invención, una proteína de la invención puede incluir diversas formas estructurales de la proteína primaria que retienen la actividad malato permeasa. Por ejemplo, una proteína de la invención puede estar en forma de sales ácidas o básicas o en forma neutra. Además, los residuos aminoácidos individuales se pueden modificar por oxidación o reducción.

25 Además de la secuencia de aminoácidos de Mae1 de longitud completa (SEQ ID NO: 2 o Figura 3), las proteínas de la presente invención incluyen truncamientos de Mae1, y análogos, y homólogos de Mae1, y sus truncamientos como se describe en el presente documento. Las proteínas truncadas pueden comprender péptidos de entre 3 y 400 residuos aminoácidos, que tienen un tamaño que abarca desde un tripéptido a un polipéptido 400-mero. Por ejemplo, una proteína truncada puede comprender la región PEST (aminoácidos 421-434) o el motivo de cremallera de leucinas (aminoácidos 214 a 235).

35 Las proteínas de la invención también pueden incluir análogos de Mae1 como se muestra en la Figura 3 o en la SEQ ID NO: 2, y/o sus truncamientos como se describe en el presente documento, que pueden incluir, pero no están limitados a Mae1 de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 2), que contiene una o más sustituciones, inserciones, y/o deleciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser de naturaleza conservativa o no conservativa. Las sustituciones de aminoácidos conservados suponen la sustitución de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de Mae1 con aminoácidos de características de carga, tamaño, y/o hidrofobicidad similares. Cuando sólo se realizan sustituciones conservadas, el análogo resultante debe ser funcionalmente equivalente a la Mae1 de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 2). Las sustituciones no conservadas suponen el reemplazo de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de Mae1 con uno o más aminoácidos que poseen características de carga, tamaño, y/o hidrofobicidad distintas.

40 Se puede introducir una o más inserciones de aminoácidos en Mae1 de *S. pombe* (SEQ ID NO: 2). Las inserciones de aminoácidos pueden constar de residuos aminoácidos únicos o aminoácidos secuenciales que abarcan una longitud de entre 2 y 15 aminoácidos.

45 Las deleciones pueden consistir en la eliminación de uno o más residuos aminoácidos, o porciones discretas (por ejemplo, una o más de la región PEST, del motivo de cremallera de leucinas) de la secuencia de Mae1 (SEQ ID NO: 2). Los aminoácidos delecionados pueden ser contiguos, o no. La longitud límite inferior del análogo resultante con una mutación de deleción es de 10 aminoácidos aproximadamente, preferentemente de 100 aminoácidos.

50 Se anticipa que si se sustituyen, insertan o eliminan aminoácidos en secuencias fuera de las regiones bien caracterizadas tales como la región PEST y el motivo de cremallera de leucinas, etc., la proteína Mae1 resultante podría tener actividad malato permeasa. Preferentemente, las modificaciones se realizan en regiones accesibles e identificables, que se encuentran sobre la superficie de la célula (véase Figura 5).

55 Las proteínas de la invención también incluyen homólogos de Mae1 (SEQ ID NO: 2) y/o sus truncamientos como se describe en el presente documento. Esos homólogos de Mae1 incluyen proteínas cuyas secuencias de aminoácidos están compuestas de las secuencias de aminoácidos de las regiones Mae1 de otras especies (en las que la secuencia de nucleótidos que codifica la región Mae1 se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas (véase descripción de las condiciones de hibridación rigurosas en el presente documento) con una sonda usada para obtener la Mae1).

60 La invención también contempla isoformas de la proteína de la invención. Una isoforma contiene el mismo número y tipo de aminoácidos que la proteína de la invención, pero la isoforma tiene una estructura molecular diferente. Las isoformas contempladas por la presente invención son aquellas que tienen las mismas propiedades que la proteína de la invención como se describe en el presente documento.

La presente invención también incluye proteínas Mae1 conjugadas con una proteína marcadora seleccionable o un péptido o una proteína heteróloga para producir proteínas de fusión. Los ejemplos de proteínas marcadoras seleccionables son G418, β -cloranfenicol, fleomicina, e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos; proteínas que confieren resistencia a herbicidas (por ejemplo, sulfometuron-metilo) y a cobre; β -galactosidasa, cloranfenicol acetil-transferasa, o luciferasa de luciérnaga. Ejemplos de proteínas heterólogas incluyen la enzima maloláctica de *L. lactis* y *L. delbrueckii* [SEQ. ID. NOS: 3 a 6], las enzimas málicas de *S. pombe* [SEQ. ID. NOS: 7 y 8], ratón, rata, humano, maíz, *P. vulgaris*, *P. deltoides*, *F. linearis*, *B. stearo*, *E. coli*, *Flaveria trinervia*, *Ascaris suum* y *Mesembryanthemum*, y las enzimas involucradas en el metabolismo del malato en plantas como se describe en el presente documento.

III. Vectores de expresión, células hospedadoras, y expresión de *mae1*

Las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención que tienen una secuencia que codifica una proteína Mae1 de la invención se pueden incorporar de manera conocida a un vector de expresión apropiado que asegura una buena expresión de la proteína. Los posibles vectores de expresión incluyen, pero no están limitados a, cósmidos, plásmidos, o virus modificados (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus asociados a adenovirus defectivos en la replicación), mientras que el vector sea compatible con la célula hospedadora usada. Por ejemplo, el vector puede ser un vector lanzadera tal como pRS315, o un vector tal como pHVX2, YEplac181, o un plásmido basado en CEN.

Los vectores se pueden seleccionar basándose en el número de copias de la molécula de ácidos nucleicos a introducir en la célula hospedadora, que a su vez está determinado por la elección del origen de replicación. Por consiguiente, se pueden seleccionar los siguientes vectores: (a) un vector replicativo (YE_p) a un número de copias elevado que tenga un origen de replicación en levaduras (por ejemplo, YEplac181); (b) un vector replicativo (YR_p) a un número de copias elevado que tenga una secuencia ARS cromosómica como origen de replicación; (c) un vector replicativo lineal (YL_p) a un número de copias elevado que tenga una secuencia telomérica como origen de replicación; y (d) un vector replicativo (YC_p) a un bajo número de copias que tenga ARS cromosómico y secuencias centroméricas.

Una molécula de ácidos nucleicos de la invención se puede integrar en el genoma de una célula hospedadora, preferentemente en el genoma de una célula de levadura, bien para sustituir o duplicar una secuencia nativa. En este caso, se puede seleccionar un vector de integración (YI_p) que no posea un origen en las células hospedadoras.

Por tanto, la invención contempla un vector de expresión que contenga una o más moléculas de ácidos nucleicos de la invención, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia(s) de proteínas insertada. En particular, el vector de expresión puede incluir secuencias promotoras y terminadoras para promover y terminar la transcripción del gen en la célula hospedadora transformada y la expresión del gen de la malato permeasa. Secuencias reguladoras adecuadas se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamíferos, o de insectos (por ejemplo, véanse las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula hospedadora seleccionada, y se puede llevar a cabo fácilmente por alguien con conocimientos ordinarios en la materia. Ejemplos de secuencias reguladoras que se pueden usar en una molécula de ácidos nucleicos de la invención incluyen los promotores y terminadores de genes para la alcohol deshidrogenasa I (ADHI), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), u otros promotores que son funcionales en *S. cerevisiae*.

Las secuencias reguladoras necesarias pueden ser suministradas por la *mae1* nativa y/o sus regiones flanqueantes. No obstante, en células hospedadoras en las que un promotor nativo sea inactivo (por ejemplo, el promotor *mae1* de *S. pombe* en cepas de *S. cerevisiae*), el promotor se puede seleccionar entre promotores adecuados de la célula hospedadora, por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa I (ADHI), y la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK) y las secuencias terminadoras apropiadas se pueden usar con *S. cerevisiae*.

Se apreciará que el nivel de expresión de una molécula de ácidos nucleicos de la invención se puede modular ajustando el número de copias de la molécula de ácidos nucleicos introducida en la célula hospedadora y/o la naturaleza de los elementos reguladores contenidos en la molécula de ácidos nucleicos.

Los vectores de expresión de la invención también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilite la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Ejemplos de genes marcadores seleccionables son genes que codifican una proteína marcadora seleccionable tal como G418, β -cloranfenicol, fleomicina, e higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos; una proteína que confiera resistencia a herbicidas (por ejemplo, sulfometuron-metilo) y a cobre; β -galactosidasa, cloranfenicol acetil-transferasa, o luciferasa de luciérnaga. Los marcadores seleccionables se pueden introducir en un vector separado de la molécula de ácidos nucleicos de interés.

Los vectores de expresión también pueden contener genes que codifican un resto que proporciona una expresión incrementada de la proteína recombinante; ayudan en la purificación de la proteína recombinante diana actuando como ligando en la purificación de afinidad; y dirige la proteína recombinante a la membrana plasmática. Por ejemplo, se puede añadir un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión, o se puede usar un péptido señal para dirigir la malato permeasa a la membrana plasmática de la cepa de levadura.

Los vectores de expresión se pueden introducir en células hospedadoras para producir una célula hospedadora transformante. “Células hospedadoras transformantes” incluyen células hospedadoras que han sido transformadas o transfectadas con un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos “transformado con”, “transfectado con”, “transformación” y “transfección” engloban la introducción de ácidos nucleicos (por ejemplo, un vector) en una célula hospedadora mediante cualquiera de numerosas técnicas habituales. Las células procariontas se pueden transformar con ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro de calcio. El ácido nucleico se puede introducir en células de mamífero mediante técnicas convencionales tales como coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. Procedimientos adecuados para la transformación y transfección de células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)), y otros manuales de laboratorio. Las técnicas de transformación más habituales que se pueden usar para cepas de levadura incluyen técnicas con protoplastos, la técnica de permeabilización a sales de litio, y electroporación. Un vector de expresión de la invención también se puede integrar en el genoma de una célula hospedadora usando procedimientos convencionales tales como el procedimiento de hibridación de colonias como se describe por Rose y col. (Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbour Press, 1990).

Para producir una proteína de fusión de esta invención, la célula hospedadora se transforma con, o se ha integrado en su genoma, una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia Mae1 fusionada a la secuencia de un péptido o proteína heteróloga seleccionada, o una proteína marcadora seleccionable, de manera deseable bajo el control de secuencias reguladoras capaces de dirigir la expresión de una proteína de fusión. A continuación la célula hospedadora se cultiva en condiciones conocidas adecuadas para la producción de proteínas de fusión.

Se pueden usar una amplia variedad de células hospedadoras procariontas y eucariotas como células hospedadoras para la expresión de la proteína Mae1 o la proteína de fusión de la invención. Por ejemplo, las proteínas de la invención se pueden expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando baculovirus), células de levadura, células de plantas, o células de mamífero. Otras células hospedadoras adecuadas se pueden encontrar en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991).

De manera más particular, la célula hospedadora es una cepa de levadura, preferentemente una cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, una cepa de levadura de *S. bayanus*, o una cepa de levadura de *Schizosaccharomyces*. Las células hospedadoras transformadas para su uso en la elaboración de vino preferentemente son cepas de levaduras del vino de *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo “Prise de Mousse” {Lallemande EC 1118}, Vin13, Vin7, N96, y WE352.

Por tanto, la presente invención incluye células eucariotas o procariontas transformadas, caracterizadas porque contienen al menos una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína Mae1, o que codifica una proteína de fusión de una proteína Mae1 y una proteína o péptido heterólogo. Un ejemplo de dicha célula hospedadora transformada es una cepa de levadura que tiene una secuencia de nucleótidos del gen *mae1* como se muestra en la Figura 3 o en la SEQ ID NO: 1, y un polipéptido funcional, que es una malato permeasa. En una forma de realización, la cepa de levadura puede ser *Saccharomyces*, transformada con un gen de la malato permeasa, en particular, una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína Mae1. En otra forma de realización, la cepa de levadura transformada puede ser *Saccharomyces*, transformada con un gen *mae1* de *S. pombe*. En otra forma de realización, la cepa de levadura transformada puede ser *Saccharomyces cerevisiae*, y el gen *mae1* se puede clonar procedente de *S. pombe*. Preferentemente, la cepa de levadura es *S. cerevisiae* que contiene una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia mostrada en la Figura 3 o en la SEQ ID NO: 1.

La presente invención también incluye células eucariotas o procariontas transformadas, caracterizadas por que contienen al menos una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión de una proteína Mae1 y una proteína o péptido heterólogo. En una forma de realización de la invención, se proporciona una cepa de levadura que contiene una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1 y una secuencia que codifica una enzima maloláctica, preferentemente que comprende el gen *mae1* de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 1) y el gen *mleS* de *L. lactis* (SEQ ID NO: 5). En otra forma de realización de la invención, la cepa de levadura es una cepa de levadura del vino que contiene una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1, y una secuencia que codifica una enzima mélica, lo más preferentemente la secuencia comprende el gen *mae1* de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 1) y el gen *mae2* de *S. pombe* (SEQ. ID. NOS: 7 y 8).

En una forma de realización de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una proteína Mae1 que comprende las etapas de: construcción de un vector que comprende una molécula de ADN recombinante que tiene la secuencia de nucleótidos definida anteriormente para transformar una célula de levaduras y permitir la síntesis de un polipéptido que transporta malato. Así, el procedimiento puede incluir el aislamiento del gen *mae1* de *S. pombe* o cualquier otro organismo; insertando el gen *mae1* en un vector de clonación, tal como un plásmido de expresión en levaduras o un plásmido basado en CEN, y la introducción del gen *mae1* en una cepa de levadura de *S. cerevisiae*, transformando así la *S. cerevisiae* en un microorganismo que transporta malato. El plásmido puede servir como base para una caracterización y manipulación posterior del gen *mae1*. La expresión del gen *mae1* en *S. cerevisiae* se puede llevar a cabo sustituyendo el promotor nativo de *S. pombe* por las secuencias promotoras y terminadoras de *S. cerevisiae*. La construcción del gen se puede subclonar, si se desea, en un vector adecuado antes de ser transformado en la cepa de levadura, o alternativamente, el gen se puede integrar en el ADN cromosómico de *S. cerevisiae*.

Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden usar para producir y aislar una proteína Mae1. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una proteína Mae1 que comprende (a) la transferencia de un vector de expresión de la invención a una célula hospedadora; (b) la selección de células hospedadoras transformadas entre células hospedadoras no transformadas; (c) el cultivo de una célula hospedadora transformada seleccionada en condiciones que permiten la expresión de la proteína Mae1; y (d) el aislamiento de la proteína Mae1.

Las proteínas Mae1 de la invención también se pueden preparar mediante síntesis química usando técnicas muy conocidas en la química de proteínas tales como síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149-2154) o síntesis en disolución homogénea (Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart).

IV. Aplicaciones

Sondas de nucleótidos

Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención permiten a aquellos expertos en la materia construir sondas de nucleótidos para su uso en la detección de secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas Mae1. Las sondas adecuadas incluyen moléculas de ácidos nucleicos basadas en secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos 6 aminoácidos secuenciales de las regiones de la proteína Mae1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, o en la Figura 3. Una sonda de nucleótidos se puede marcar con una sustancia detectable tal como un marcador radiactivo que proporcione una señal adecuada y tenga una semivida suficiente tal como ^{32}P , ^3H , ^{14}C o similares. Otras sustancias detectables que se pueden usar incluyen antígenos que son reconocidos por un anticuerpo marcado específico, compuestos fluorescentes, enzimas, anticuerpos específicos para un antígeno marcado, y compuestos luminiscentes. Un marcador apropiado se puede seleccionar teniendo en cuenta la velocidad de hibridación y la unión de la sonda al nucleótido a detectar y la cantidad de nucleótido disponible para la hibridación. Las sondas marcadas se pueden hibridar a ácidos nucleicos sobre soportes sólidos tales como filtros de nitrocelulosa o membranas de nailon tal y como se describe de manera general en Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.). Las sondas de ácidos nucleicos se pueden usar para detectar genes, preferentemente en células de levadura, que codifiquen proteínas Mae1.

Anticuerpos

Las proteínas Mae1 de la invención se pueden usar para preparar anticuerpos específicos para las proteínas. Se pueden preparar anticuerpos que se unan a un epítipo distinto en una región sin conservar de la proteína. Una región sin conservar de la proteína es aquella que no tiene una homología de secuencia sustancial con otras proteínas, por ejemplo, las regiones fuera de las PEST conservadas o los motivos de cremallera de leucinas como se describe en el presente documento. Se puede usar una región procedente de uno de los dominios bien caracterizados (por ejemplo, regiones PEST) para preparar un anticuerpo para una región conservada de una proteína Mae1. También se pueden generar anticuerpos que tengan especificidad para una proteína Mae1 a partir de proteínas de fusión creadas mediante la expresión de proteínas de fusión en bacterias como se describe en el presente documento.

Se pueden usar procedimientos convencionales para preparar los anticuerpos. Por ejemplo, usando un péptido de una proteína Mae1, se puede preparar antisuero policlonal o anticuerpos monoclonales usando procedimientos habituales [por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256, 495-497 (1975)) así como otras técnicas tales como la selección de librerías combinatorias de anticuerpos (Huse y col., Science 246, 1275 (1989))]. El término "anticuerpos" incluye fragmentos de anticuerpos que también reaccionen específicamente con una proteína, o péptido que tenga la actividad de una proteína Mae1.

Se pueden usar anticuerpos específicamente reactivos con una proteína Mae1, o derivados, tales como conjugados enzimáticos o derivados marcados, para detectar Mae1 en diversas muestras, por ejemplo, levaduras o plantas, por ejemplo, se pueden usar en cualquier inmunoensayo conocido que dependa de la interacción de unión entre un determinante antigénico de una proteína Mae1 y los anticuerpos. Ejemplos de esos ensayos son radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA), inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, aglutinación con látex, y hemaglutinación.

Procedimientos de mediación de la captación de malato, ácido succínico y malonato

Una proteína Mae1 de la invención se puede usar para identificar sustancias que afecten a la actividad de la proteína, y así pueden ser útiles en la mediación del transporte del L-malato, succinato, o malonato en una célula, preferentemente un microorganismo (por ejemplo, una levadura) o la célula de una planta. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para identificar una secuencia que medie en el transporte de L-malato, succinato o malonato que comprende la incubación de una proteína Mae1 de la invención con un sustrato de la proteína Mae1, y una sustancia de prueba que sea sospechosa de afectar a la actividad de la proteína Mae1, y la determinación del efecto de la sustancia comparándola con un control. La sustancia puede ser una sustancia natural o sintética.

En particular, la invención proporciona un procedimiento para identificar una sustancia que medie en el transporte de L-malato, succinato, o malonato en un microorganismo (por ejemplo, una levadura) que comprende el cultivo en presencia de malato, succinato o malonato y una sustancia de prueba que sea sospechosa de afectar a la actividad de una proteína Mae1, de un microorganismo que ha sido transformado con una molécula de ácidos nucleicos de la invención que contiene una secuencia que codifica una proteína Mae1, y expresa una proteína Mae1, el ensayo para la captación de malato, succinato, o malonato, y la determinación del efecto de la sustancia comparándola con un control en el que el microorganismo se cultiva sin la sustancia de prueba. El malato, succinato o malonato se pueden marcar con una sustancia detectable como se describe en el presente documento.

Las sustancias identificadas usando los procedimientos de la invención así como moléculas de ácidos nucleicos antisentido, y anticuerpos, pueden reducir la expresión o la actividad de la proteína Mae1 en una célula, preferentemente un microorganismo o la célula de una planta, afectando así a la captación de malato, ácido succínico y malonato por la célula. Los inhibidores de una proteína Mae1 pueden ser particularmente útiles en la elaboración de vino cuando la cepa de levadura del vino usada sea muy eficiente en la degradación de malato. Las sustancias inhibidoras pueden ser particularmente útiles en regiones cálidas, en las que normalmente hay insuficiente ácido en el vino y el ácido se debe añadir para convertir vinos planos e insípidos en vinos agradables.

Las sustancias identificadas usando el procedimiento de la invención que estimulan la actividad de una proteína Mae1 de la invención pueden ser particularmente útiles en la mejora de la fermentación maloláctica o maloetanólica. Las sustancias estimuladoras pueden ser útiles en el incremento de la captación de malato y pueden tener una aplicación particular en la elaboración de vino usando cepas de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*) que no eliminan eficazmente el malato.

Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para transformar una célula, preferentemente un microorganismo o la célula de una planta, para así mediar en la captación y el metabolismo del L-malato, ácido succínico, o malonato por la célula. En particular, la molécula de ácidos nucleicos pueden hacer que una célula, preferente un microorganismo, sea capaz de degradar eficazmente el malato. En una forma de realización de la invención se proporciona un ADN recombinante que se usa para transformar un microorganismo para así dotarlo de la capacidad de degradar eficazmente el malato, el ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que media en la captación de malato, y que permite la síntesis del polipéptido por el microorganismo transformado.

Más particularmente, según la invención se proporciona una molécula de ADN recombinante para su uso en la transformación de una cepa de levadura para así dotarla de la capacidad de degradar eficazmente el malato, dicho ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la malato permeasa o un intermedio de la misma, o codifica al menos en gran parte su secuencia de aminoácidos que mediará en la captación de malato, y permite la expresión de malato permeasa en la levadura transformada.

Se pueden usar células hospedadoras (por ejemplo, microorganismos y células de planta) de la invención que contienen una molécula de ácidos nucleicos de la invención para mediar en la captación y el metabolismo del L-malato, ácido succínico, o malonato. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento de mediación en la captación y el metabolismo del L-malato, ácido succínico, o malonato que comprende el crecimiento en presencia de una fuente de L-malato, ácido succínico, o malonato, de una célula transformada con una molécula de ácidos nucleicos de la invención. En una forma de realización de la invención, se contempla un procedimiento de degradación del malato que incluye el cultivo, en presencia de una fuente de malato, de un microorganismo que ha sido transformado con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que media en la captación de malato. Preferentemente, el microorganismo se transforma con una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1, lo más preferentemente de la secuencia comprende el gen *mae1* de *S. pombe* {Figura 3 o SEQ ID NO: 1}.

Más específicamente, según la invención se proporciona un procedimiento de degradación del malato que incluye el cultivo en presencia de una fuente de malato, de una cepa de levadura que ha sido transformada introduciendo en la cepa de levadura, una secuencia de nucleótidos que codifica la malato permeasa o un intermedio de la misma, o codifica al menos en gran parte su secuencia de aminoácidos que mediará en la captación de malato, y que incluye un promotor y un terminador para la promoción y terminación la transcripción, y la expresión del gen de la malato permeasa. Preferentemente la cepa de levadura es *S. cerevisiae* que contiene una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1, lo más preferentemente la secuencia comprende el gen *mae1* de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 1).

El procedimiento de la invención para la degradación de malato usando células hospedadoras transformadas de la invención es particularmente útil en la elaboración del vino, y proporciona un medio simple y menos caro de degradar eficazmente el malato durante, o después de la etapa de fermentación alcohólica. Por tanto, la invención también contempla un procedimiento de degradación del malato durante la fermentación del vino, cuyo procedimiento incluye, el cultivo, en mostos de uva que contienen una fuente de malato, de una cepa de levadura transformada por una molécula de ácidos nucleicos de la invención. En una forma de realización de la invención la cepa de levadura es transformada mediante material de ADN recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una malato permeasa funcional o un intermedio de la misma, o codifica al menos en gran parte su secuencia de nucleótidos que proporcionará actividad malato permeasa, y que adicionalmente codifica un promotor para la promoción de la

transcripción de la secuencia de nucleótidos y la conducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos, y un terminador para terminar la transcripción de la secuencia de nucleótidos que da como resultado una permeasa para transportar el malato a las células de levadura.

5 Según la invención también se proporciona un procedimiento de fermentación del vino, que incluye el cultivo, en un medio de fermentación del vino que incluye mosto de uva que contiene una fuente de malato, de una cepa de levadura transformada por una molécula de ácidos nucleicos de la invención. En una forma de realización de la invención la cepa de levadura es transformada con un material de ADN recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una malato permeasa funcional o un intermedio de la misma, o codifica al menos en gran parte su secuencia de nucleótidos que proporcionará actividad malato permeasa, y que adicionalmente codifica un promotor para la promoción de la transcripción de la secuencia de nucleótidos y la conducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos, y un terminador para terminar la transcripción de la secuencia de nucleótidos, que da como resultado una permeasa para transportar el malato a las células de levadura.

15 La cepa de levadura usada en los procedimientos de la invención para la fermentación del vino puede ser una cepa de levadura del vino que contiene una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1, lo más preferentemente la secuencia que comprende el gen *mae1* de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 1). En una forma de realización preferida de la invención, la cepa de levadura contiene una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1 y una secuencia que codifica una enzima maloláctica, preferentemente que comprende el gen *mae1* de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 1) y el gen *mleS* de *L. lactis* (SEQ ID NO: 5). En otra forma de realización preferida de la invención, la cepa de levadura es una cepa de levadura del vino que contiene una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica una proteína Mae1, y una secuencia que codifica una enzima málica, lo más preferentemente la secuencia comprende el gen *mae1* de *S. pombe* (Figura 3 o SEQ ID NO: 1) y el gen *mae2* de *S. pombe* [SEQ. ID. NO: 7]. Los presentes inventores han demostrado que cepas de *S. cerevisiae* recombinante que contienen los genes *mae1* y *mae2* de *S. pombe* bajo el control de señales promotoras y terminadoras de *S. cerevisiae* degradan 8-9 g/l de malato.

Ejemplos de cepas de levadura del vino que se pueden usar en los procedimientos de la invención son cepas del vino de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* incluyendo las cepas de levadura del vino industriales Bourgovin RC 212, ICV 0-47, 71B-1122, KIV-1116 (Lallemande) "Prise de Mousse" (Lallemande EC 1118), Vin 7, Vin 13, N96, y WE352 {Dept. of Microbiology, University of Stellenbosch}.

Las cepas de levadura de la presente invención que contienen una molécula de ácidos nucleicos que codifica una enzima maloláctica (por ejemplo, mies) serán útiles en la degradación de malato a L-lactato y CO₂ durante la fermentación alcohólica (es decir, la fermentación maloláctica), mientras que las cepas de levadura que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima málica (por ejemplo, *mae2*) serán útiles en la degradación de malato a etanol y CO₂ después de la fermentación alcohólica (fermentación maloetanólica). Las cepas de levadura que contienen una molécula de ácidos nucleicos que codifica una enzima maloláctica también pueden ser cepas sensibles al etanol. Estas cepas sensibles al etanol se pueden usar como co-cultivos junto con cepas de levadura del vino industriales.

Las cepas de levadura de la invención que son particularmente útiles en la fermentación del vino se pueden seleccionar basándose en su eficacia de fermentación usando una versión automatizada de un mini-fermentómetro como se describe por Reed y Chen (Am J Enol Vitic 29:165, 1978). Las cepas seleccionadas basadas en las pruebas de eficacia de la fermentación se pueden escalar para producciones de lotes y se pueden evaluar para parámetros tales como la eficacia de conversión, la tolerancia al frío, fase de adaptación a corto, tolerancia al etanol, tolerancia al SO₂, baja actividad espumante, degradación del malato, floculación al final de la fermentación, y resistencia a zimotoxinas asesinas. Los ensayos organolépticos también se pueden realizar usando procedimientos convencionales. Un vinatero puede seleccionar cepas para la fermentación maloetanólica o la fermentación maloláctica basándose en la composición del mosto y el estilo del vino.

Se apreciará que las moléculas de ácidos nucleicos, las células hospedadoras, y los procedimientos de la invención se pueden usar para mediar en la captación de malato, ácido succínico, o malonato en campos tecnológicos diferentes a la elaboración del vino. Por ejemplo, el incremento de la captación de malato y el metabolismo del malato usando moléculas de ácidos nucleicos de la invención para así incrementar la producción de etanol, puede ser útil en fermentaciones de vino y de zumo de frutas para la producción de licores alcohólicos tales como el brandy.

En plantas, el malato desempeña una función fundamental en la mayoría de orgánulos. El malato lleva a cabo las siguientes funciones importantes en plantas: (i) el malato es un intermedio en el ciclo del ácido tricarbóxico, y la acumulación de malato puede servir como energía respiratoria durante la noche; (ii) el malato es el almacén tanto para el CO₂ como para los equivalentes de reducción en el CAM; (iii) una lanzadera de oxaloacetato-malato media en el transporte de los equivalentes de reducción al citosol o los peroxisomas, y puede actuar en la generación de NADH apoplástico que se usa en una reacción compleja para generar H₂O₂ apoplástica; (iv) el malato se puede usar como sustancia osmótica; (v) la síntesis y degradación del ácido málico son componentes del mecanismo del estado del pH; (vi) la síntesis de malato equilibra la captación desigual de cationes o aniones por parte de las raíces; (vii) el malato es un componente importante del exudado de algunas raíces de plantas que incrementa la disponibilidad de fosfato en el suelo; y (viii) el malato modula la dependencia del voltaje del canal de aniones estomatal y puede ser parte del mecanismo sensor del CO₂ (E. Martinoia y D. Rentsch, Acta. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol 1994, 45: 447-67).

Las moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas Mae1, o equivalentes funcionales de proteínas Mae1, y opcionalmente genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo del malato en plantas como se describe en el presente documento), las células hospedadoras que contienen las moléculas de ácidos nucleicos, y las sustancias de la presente invención pueden ser útiles en la modulación del metabolismo del malato en plantas afectando de esa forma a una o más funciones como se ha descrito anteriormente. En particular, las moléculas de ácidos nucleicos, células hospedadoras, y sustancias de la presente invención pueden ser útiles en la modificación del transporte del malato en orgánulos de plantas tales como cloroplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas, y simbiosomas para afectar de esa forma al metabolismo del malato en los orgánulos. Las moléculas de ácidos nucleicos, células hospedadoras, y sustancias de la presente invención pueden ser útiles en la modulación de la eficiencia mediante la cual algunas plantas convierten el CO₂ en carbohidratos. Además, el ácido málico desempeña un papel muy importante como reservorio energético en el ciclo diurno del metabolismo de plantas superiores. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos de la invención pueden ser usadas en plástidos, cloroplastos, mitocondrias, y otros orgánulos de plantas superiores para controlar el metabolismo del malato que da lugar a la construcción de plantas de mayor eficiencia energética de interés agrícola u otro interés comercial.

La invención se entenderá con mayor profundidad por referencia a los siguientes ejemplos. No obstante, se pretende que los ejemplos sean meramente ilustrativos de formas de realización de la invención y no se deben interpretar como una limitación del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación y caracterización de la Mae1

Cepas y condiciones de crecimiento: Se usó la cepa de *Escherichia coli* HB101 (*hsd20 leuB supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13 mcrB*). Los procedimientos para la manipulación de las células y el ADN de *Escherichia coli* se basan en los de Sambrook y col. (1989). Además, también se usó en este estudio una cepa haploide de *Schizosaccharomyces pombe* 912 leu 1-32 h- (tipo silvestre), y un mutante *mae1*- haploide de *S. pombe* leu 1-32 T-h *mae1*- (Osothsilp y Subden, 1986b). Las células de levadura se crecieron en YE (2% de glucosa, 0,5% de extracto de levadura), MM (Alfa y col., 1993) más leucina y medio YEPD (1% de extracto de levadura, 2% de Bactopeptona, 2% de glucosa), suplementado con el 0,8% de ácido L-málico (Sigma, St. Louis, MO) si fuera necesario. Los transformantes se seleccionaron en YNB (0,17% de base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos y (NH₄)₂SO₄, [Difco Laboratories, Detroit, MI], 0,5% de (NH₄)₂SO₄, 2% de glucosa, 1,7% de bacto-agar [Difco Laboratories, Detroit, MI] y agar indicador de malato-glucosa (MGIA), descrito previamente por Osothsilp y Subden (1986b).

Transformación de levaduras: Las células de *S. pombe* se transformaron por electroporación (Prentice, 1992).

Electroforesis en gel de campo pulsado y transferencia de Southern: La transferencia cromosómica se realizó como se describe por Viljoen y col. (1994). En la transferencia de Southern se usaron procedimientos habituales (Sambrook y col., 1989). Se usó una membrana de nailon Hybond-N de 0,45 μm (Amersham International, Buckinghamshire, RU). Se usó el kit de mareaje de ADN cebado aleatoriamente {Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) para el radiomarcado de la sonda *mae1*.

Transferencia de Northern: El aislamiento del ARN se realizó según Viljoen y col. (1994). El ARN total se separó en un gel desnaturizante al 0,8% de agarosa/formaldehído 2,2 M y se transfirió a una membrana de nailon Hybond-N de 0,45 μm (Amersham International, Buckinghamshire, RU) como se describe por Sambrook y col. (1989).

Clonación del gen mae1: Se usó una librería genómica HindIII de *S. pombe* preparada en un vector lanzadera WH5 por Paul Young (Queen's University, Kingston, Ontario) para transformar la cepa de *S. pombe* leu1-32 *mae1*, h- según el procedimiento de Beach y col. (1982). Los transformantes se transfirieron a 100 μl de medio indicador líquido MG1 (Osothsilp y Subden, 1986b). La complementación se determinó colorimétricamente y a continuación se confirmó mediante ensayos de la actividad transportadora (Osothsilp y Subden, 1986b).

Un subclon EcoRI de 5,4 kb y un subclon SmaI de 3,4 kb en pRS315 (Sikorski y Hieter, 1989) se transformaron en el mutante *mae1* para determinar qué fragmento contenía el gen *mae1*.

Análisis de la secuencia de ADN de mae1

Para secuenciar el fragmento clonado, se realizaron digestiones unidireccionales con la exonucleasa III (Sambrook y col., 1989). Los derivados de deleción se transformaron en *E. coli* (Tschumper y Carbón, 1980).

El plásmido de ADN se aisló a partir de los transformantes usando el método de lisis alcalina de Lee y Rasheed (1990) y se digirió con PvuII para determinar los tamaños de los fragmentos obtenidos. Los fragmentos solapados se seleccionaron por análisis de la secuencia de ADN {Tabor y Richardson, 1987) y el fragmento de ADN que contiene el gen *mae1* se secuenció en ambas direcciones usando Sequenase v2.0 (US Biochemical Corp., Cleveland, OH).

La secuencia de nucleótidos se analizó con el paquete de programas del Genetics Computer Group. Se realizaron búsquedas en la base de datos del Genbank usando los programas FASTA y TFASTA y usando BLAST sobre el servicio de archivos NCB1 (Altschul y col., 1990). Los segmentos transmembrana de la proteína *mae1* se predijeron mediante los métodos de Eisenberg y col. (1984) y Rao y Argos (1986).

5 *Ensayos del transporte para los ácidos L-málico y succínico:* Se recogieron células de levadura en la fase de crecimiento logarítmica (DO de 1,2 a A₅₉₅) y se lavaron tres veces con KCl 0,1 M (pH 3,5). Las células se suspendieron en 4 ml de KCl 0,1 M (pH 3,5) y se almacenaron a 4°C. Los ensayos del transporte se completaron en 3 h. Las suspensiones celulares se pre-incubaron durante 5 minutos en un baño de agua agitador a 30°C a 100 rpm. Los ensayos se iniciaron añadiendo 25 μ l de L-malato marcado con ¹⁴C (45 μ Ci/ μ mol) (Amersham), 100 μ l de ácido succínico (42 μ Ci/ μ mol) (ICN), 100 μ l de ácido malónico (56,7 μ Ci/ μ mol) (Du Pont) o 100 μ l de α -cetoglutarato (51,8 μ Ci/ μ mol) (Du Pont). Se retiró una muestra de 0,5 ml a intervalos de 10, 20, 40, 60, y 120 segundos, se filtró rápidamente a través de membranas de 0,45 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA), y se lavó inmediatamente tres veces con cantidades de 5 ml de KCl 0,1 M enfriado en hielo (pH 3,5). Los filtros que contiene las células se secaron al horno a 50°C y se pusieron en viales de centelleo que contienen 5 ml de mezcla de reacción de centelleo (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Se usaron células llevadas previamente a ebullición (5 min) para determinar la unión no específica del [¹⁴C] malato, succinato, malonato y α -cetoglutarato a las células de levadura.

20 *Clonación y subclonación del gen *mae1*:* El gen *mae1* se clonó a partir de una librería genómica HindIII de *S. pombe* por complementación de un mutante transportador. Osothsilp y Subden (1986b) generaron diversos mutantes de *S. pombe* que eran incapaces de utilizar el malato. Un subclon SmaI de 3,4 kb fue el fragmento más pequeño capaz de restaurar completamente del transporte del L-malato en el mutante.

25 *Localización cromosómica del gen *mae1*:* El análisis de Southern de geles CHEF (Figura 1) confirmó la localización del gen *mae1* sobre el cromosoma I (Osothsilp, 1987). El análisis de la secuencia reveló que el gen *mae1* está localizado 2842 pb en 5' al gen *MFm1* (Davey, 1992) (Figura 2).

30 *Secuencia de nucleótidos del gen *mae1*:* La secuencia del gen *mae1* de *S. pombe* se ha enviado al GenBank con el número de acceso U21002 pero no está disponible al público o a cualquier otra persona distinta del solicitante sin la autorización del solicitante. En la Figura 2 se muestra un mapa de restricción del gen *mae1*. La secuencia de nucleótidos del gen *mae1* de la invención se da en la Figura 3. El análisis de la secuencia de ADN reveló un marco de lectura abierto de 1314 pb. Las búsquedas de homología de la base de datos del GenBank v72.0 llevada a cabo para la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de la proteína, no reveló ninguna similitud significativa con otras secuencias de ADN o proteínas. Una secuencia TATAT prominente repetida (cuatro veces) estaba localizada de -153 a -175 pb aguas arriba del codón ATG. Se encontró una repetición directa de 10 pb TCATTTTTTA separada por 9 pb en las posiciones -258 a -267 y -277 a -286.

40 *Características de la proteína *mae1*:* Se ha predicho que el gen *mae1* codifica una proteína de 435 residuos aminoácidos (aa) con un peso molecular predicho de 49 kDa aproximadamente. El perfil de hidropatía de la secuencia de aa deducida (Figura 4) reveló una proteína con N y C-terminos hidrófilos y diez hélices putativas que se extienden a través de la membrana, típicas de proteínas de transporte de membrana. Los 36 aa N-terminales y los 65 aa C-terminales son altamente hidrófilos. No se encontró péptido señal en el N-término pero no se debe descartar la presencia de un péptido señal interno. Varias proteínas de membrana sin una secuencia señal en el N-término, por ejemplo, la arginina permeasa codificada por CAN 1 (Hoffmann, 1985) y la proteína GAL2 (Tschopp y col., 1986) de *S. cerevisiae* no contienen secuencia señal.

45 Los segmentos transmembrana de la proteína *mae1* se predijeron mediante los métodos de Eisenberg y col. (1984) y Rao y Argos (1986).

50 Se construyó un modelo estructural para la malato permeasa mediante análisis por ordenador (Figura 5). Dos enlazadores hidrófilos prominentes, de 20 y 25 aa de largo, están localizados entre los dominios hidrófobos que se extienden a través de la membrana dos y tres, y siete y ocho, respectivamente. La longitud de los otros enlazadores hidrófilos abarca entre 7 y 12 aa.

55 Varios motivos conservados fueron reconocidos en la proteína *mae1*. En el extremo C-terminal se encuentra una región PEST (aa 421-434) bien conservada. Muchas proteínas con semi-vidas intracelulares inferiores a 2 h contienen una o más regiones PEST, que constan de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), treonina (T) y en un menor grado ácido aspártico (Rogers y col., 1986).

60 Un motivo de cremallera de leucinas (aa 214 a 235), que consta de cuatro residuos leucina espaciados por 6 aa, está localizado entre los dominios que se extienden a través de la membrana seis y siete. La periodicidad de una leucina o isoleucina cada siete residuos (Landschulz y col., 1988) se ha observado en varias proteínas transportadoras (Bisson y col., 1993). En transportadores de la glucosa en mamíferos y en muchos de los transportadores fúngicos se encuentra un motivo de cremallera conservada en o cerca del segundo dominio transmembrana putativo (White y Weber, 1989). Se ha demostrado que estos motivos median en las interacciones proteína-proteína en diversos sistemas por medio de una estructura helicoidal enrollada. No se sabe si este motivo tiene alguna función en los transportadores. No obstante, en general existe un elevado grado de conservación de este motivo entre transportadores eucariotas (Bisson y col., 1993).

La proteína *mae1* contiene tres sitios potenciales de glicosilación unidos a N localizados en los aa 193, 277 y 336. Los posibles sitios de fosforilación de la proteína quinasa C se encuentran en la posición 28: phvplSqrkh y en la posición 94: ikypsTikdsw.

5 *Expresión del gen mae1*: El análisis de Northern reveló que el gen *mae1* codifica un único transcrito de 1,5 kb aproximadamente. La expresión del gen *mae1* en presencia de glucosa, rafinosa o fructosa (Figura 6) reveló que el gen *mae1* de *S. pombe* no estaba sujeto a la represión catabólica como se ha informado previamente para los genes de la malato permeasa de *C. utilis* (Cassio y Leao, 1993) y *H. anomala* (Corte-Real y Leao, 1990).

10 *Transporte del ácido málico y ácido succínico mediante la permeasa mae1 de S. pombe*: Los ensayos de transporte del ácido málico, succínico, malónico y α -cetoglutárico se realizaron usando una cepa de tipo silvestre de *S. pombe*, un mutante *mae1*- y el mutante *mae1*- complementado con el gen *mae1*. El fragmento SmaI de 3,4 kb que contiene el gen *mae1* clonado en pRS315 restauró completamente el transporte de los ácidos L-málico (Figura 7 (a)), succínico (Figura 7(b)) y malónico en el mutante *mae1*-. El α -cetoglutárico no fue transportado por ninguna de las cepas de *S. pombe* usadas en los ensayos de transporte.

15 Sousa y col. (1992) afirmaron que la inhibición competitiva de las velocidades de captación inicial del ácido L-málico por el ácido succínico, ácido D-málico, ácido fumárico, ácido oxaloacético, ácido α -cetoglutárico, ácido maleico y ácido malónico sugiere que estos ácidos son transportados por el mismo transportador. Los resultados muestran que el gen *mae1* de *S. pombe* codifica una permeasa general para el L-malato, succinato y malonato.

Estos datos muestran una permeasa de ácidos dicarboxílicos C₄ en eucariotas.

25 Ejemplo 2

Expresión funcional de los genes mae1 y mae2 de S. pombe en S. cerevisiae

30 *S. cerevisiae* no puede degradar eficazmente el malato debido a la ausencia de un transportador de malato, y una enzima málica con una baja afinidad por el sustrato. En contraste, *S. pombe* degrada el malato activamente puesto que la levadura contiene una permeasa para el malato y una enzima málica con una elevada afinidad por el sustrato (Figura 8). Las fusiones de lacZ demostraron que los promotores de los genes *mae1* (SEQ ID NO: 1) y *mae2* (SEQ ID NO: 3) de *S. pombe* no son funcionales en *S. cerevisiae*. Para expresar estos genes en *S. cerevisiae*, los marcos de lectura abiertos (ORFs) de *mae1* y *mae2* de *S. pombe* se subclonaron en cassettes de expresión que contienen las secuencias promotoras y terminadoras de la alcohol deshidrogenasa (ADH1) y la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK1) de *S. cerevisiae*. Las diferentes construcciones empleadas en este estudio se listan en la Tabla 1.

35 Todos los plásmidos listados en la Tabla 1 se transformaron en la cepa de laboratorio YPH259 de *S. cerevisiae* (Sikorski, 1989). Las cepas de *S. cerevisiae* recombinantes que contienen el gen *mae1* eran capaces de transportar activamente el L-malato (Figura 9), demostrando así la síntesis, la modificación post-traducciona correcta y la inserción de la proteína Mae1 de *S. pombe* Mae1 en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Se investigó la capacidad de las cepas de *S. cerevisiae* recombinante, que contienen los genes *mae1* y *mae2* de *S. pombe* bajo el control de las señales promotoras y terminadoras de *S. cerevisiae*, para degradar 8-9 g/l de L-malato en medio basado en glicerol-etanol al 2% (condiciones respiratorias) y basado en glucosa al 2% (condiciones fermentativas) (Figs. 10 y 11).

40 Las cepas de levadura control YADH y YPGK sólo degradaron cantidades insignificantes de L-malato después de 22 días. Las cepas recombinantes YADH-*mae1* y YPGK-*mae1* que sólo contienen permeasa, mostraron una capacidad incrementada para degradar L-malato (Figs. 10 y 11) que probablemente se consiguió con la enzima málica nativa de *S. cerevisiae*. La degradación del L-malato mediante cepas recombinantes que contienen solamente la enzima málica de *S. pombe*, no fue significativamente diferente de la de las levaduras control. No obstante, cuando se introdujeron tanto el gen de la malato permeasa (*mae1*) como el gen *mae2* de *S. pombe*, se produjo la degradación completa del L-malato.

45 En medio glicerol-etanol al 2% y glucosa al 2%, la cepa recombinante MAL2 fue capaz de degradar completamente el L-malato el 7 y 19 días, respectivamente (Figs. 10 y 11). Comparada con MAL2, la cepa recombinante MAL1 degradó el malato menos eficazmente en ambos medios de glicerol-etanol y glucosa. Este fenómeno posiblemente se puede explicar por el hecho de que el gen *mae2*, bajo el control del promotor de ADH1 (MAL2), se expresa más intensamente que el gen *mae2* bajo el control del promotor de PGK1 (MAL1). También es posible que la sobreexpresión de la proteína Mae1 pueda tener un efecto disruptor sobre la membrana celular de la levadura. Este efecto habría sido más severo en la construcción en la que el gen *mae1* está bajo el control del promotor de ADH1 más fuerte.

50 La capacidad de las cepas MAL1 y MAL2 para metabolizar el L-malato difería considerablemente en el medio de glicerol-etanol y el medio de glucosa. Ambas cepas recombinantes se comportaron mucho más eficazmente en glicerol-etanol que en el medio de glucosa. En glicerol-etanol, el 92% (7 g/l) del L-malato fue degradado rápidamente en 4 días por la cepa MAL2 (Figura 10), mientras que en el medio de glucosa (Figura 11) esta cepa degradó el L-malato mucho más despacio; después de 4 días sólo el 27% del malato había sido degradado. La degradación completa del L-malato en medio de glucosa ocurrió sólo después de 18-19 días. Ni el promotor de PGK1 ni el promotor de ADH1 usados estaban sometidos a la regulación de la glucosa; la expresión de los genes *mae1* y *mae2* en el medio de glucosa se confirmó mediante análisis de transferencia de Northern y Western.

ES 2 336 977 T3

Este estudio ha demostrado que *S. cerevisiae* requiere una permeasa para degradar eficazmente el malato. En contraste a numerosos intentos infructuosos en otras partes, se diseñó una cepa de *S. cerevisiae* por ingeniería genética que degrada hasta 8 g/l de L-malato en 7 días en condiciones aeróbicas.

5

Ejemplo 9

Fermentación maloláctica en mostos de Cuba mediante una cepa modificada por ingeniería genética de S. cerevisiae

10 En el estudio resumido en este ejemplo se usaron los siguientes materiales y procedimientos:

Cepas y plásmidos: Las diferentes cepas y plásmidos empleados se listan en la Tabla 2.

15 *Subclonación de los genes mae1 y mleS:* Las manipulaciones del ADN se realizaron en el vector lanzadera de la levadura *E. coli* YEplac181 (Gietz y Sugino, 1988). Se obtuvo el vector de expresión pHVX2 (Tabla 2) por subclonación de un fragmento HindIII a partir del plásmido pJC (Crous y col., 1995), que contiene las secuencias promotoras y terminadoras de PGK1 en el sitio HindIII de Yeplac181 (Figura 15). El ORF de *mae1* se aisló como fragmento Ball-NdeI a partir del plásmido pJG1 (Grobler y col., 1996) y se subclonó en YEplac181 que contiene un sitio de clonación múltiple con los sitios de restricción EcoRI, BallI, NdeI y BglII. El ORF de *mae1* se volvió a aislar en forma de fragmento EcoRI-BglII y se subclonó en el sitio EcoRIIBglII de pHvX2 para dar el plásmido pHV3 (Figura 15). La clonación y expresión del gen *mleS* de *L. lactis* en *S. cerevisiae* ha sido descrita previamente (Denayrolles y col., 1994).

25 *Condiciones de cultivo:* *E. coli* JM10 9 (Tabla 2) se creció en caldo Terrific {1,2% de triptona, 2,4% extracto de levadura, 0,4% de glicerol y 10% (v/v) de disolución tampón de KH₂PO₄ 0,17 M y K₂HPO₄ 0,72 M} a 37°C. Los transformantes de *E. coli* se seleccionaron en medio LB (0,5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, 1% de triptona) suplementado con ampicilina.

30 Las células de levadura se cultivaron en medio YPD líquido (1% de extracto de levadura, 2% de bactopectona, 2% de glucosa) a 30°C. *S. cerevisiae* se transformó con los plásmidos pHV3 y pMDMALO juntos, así como con pHVX2, pHV3 o pMDMALO independientemente (Tabla 2). Los transformantes se aislaron sobre placas de agar YNB selectivas (0,17% de base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos (aa) y sulfato de amonio [Difco Laboratories, Detroit, MI], 0,5% de (NH₄)₂SO₄, 2% de glucosa y 1,7% de agar, suplementado con el 0,002% (p/v) de adenina, histidina y el 0,003% (p/v) de licina con o sin uracilo y leucina, o ambos. Los transformantes se cultivaron a una elevada densidad celular en medio líquido YNB maloláctico 10 a 30°C, se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en zumo de uva estéril antes de la inoculación en mosto de uva.

40 *Fermentación maloláctica en mostos de uva:* Las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contienen los diferentes plásmidos se inocularon a una concentración final de 2×10^6 células/ml en 200 ml de mosto (precalentado a 15-20°C) en contenedores de vidrio de 250 ml. Los mostos de Cabernet Sauvignon (2,8 g/l de L-malato) y Shiraz (3,2 g/l de L-malato) se fermentaron a 20°C y el mosto de Chardonnay (3,4 g/l de L-malato) a 15°C, sin agitación. Ambos mostos de uva roja y uva blanca se suplementaron con el 0,07 5% de fosfato de diamonio antes de la inoculación.

45 La concentración de malato durante la fermentación se midió enzimáticamente usando el kit de prueba L-Malic Acid Test Kit (Boehringer Mannheim, Alemania). La conversión de malato en lactato se visualizó por cromatografía en papel según procedimientos habituales. Se usó el recuento en placa sobre placas de agar YPD para determinar el número de células viables y el crecimiento de las cepas malolácticas de *S. cerevisiae*.

50 En este estudio se construyó una cepa recombinante de *S. cerevisiae*, que contiene tanto el gen *mae1* de *S. pombe* (SEQ ID NO: 1) como al gen *mleS* de *L. lactis* (SEQ ID NO: 2). Se investigó la capacidad de la cepa recombinante para llevar a cabo la fermentación maloláctica en mostos de uva Cabernet Sauvignon, Shiraz y Chardonnay. La cepa de levadura recombinante (MLF1), que contiene tanto el gen *mae1* de *S. pombe* como el gen *mleS* de *L. lactis*, degradó eficaz y rápidamente el L-malato a L-lactato en el mosto de uva en un periodo de tiempo significativamente corto (Figs. 12 y 13). Las cepas de levadura control, que sólo contienen el cassette de expresión de PGK1 (pHVX2), o el gen *mleS* (pMDMALO) o el gen *mae1* (pHV3) bajo el control del promotor de PGK1, eran incapaces de degradar el L-malato en L-lactato y CO₂.

60 El metabolismo rápido y completo de 2,8 g/l de L-malato en mosto de Cabernet Sauvignon se obtuvo en 3 días (Figura 12). En mosto de Chardonnay, 3,4 g/l de L-malato se degradaron a lactato en 7 días a 15°C. (Figs. 13 y 14). También se consiguió una fermentación maloláctica rápida (2 días) con la cepa recombinante en el mosto de la uva Shiraz.

65 La integración de los genes *mae1* y *mleS* en los genomas de las cepas de levadura del vino debe producir cepas que sean capaces de degradar el malato en lactato y CO₂ durante la fermentación alcohólica. Una aproximación alternativa es construir cepas malolácticas de *S. cerevisiae* sensibles al etanol que se pueden usar como co-cultivos junto con cepas de levadura del vino industriales. El uso de cepas malolácticas de *S. cerevisiae* sensibles al etanol durante la vinificación debe dar como resultado una degradación rápida y completa del malato en lactato. No obstante, se evitará la expansión de levaduras malolácticas en una bodega puesto que estas células de levadura morirán durante las últimas

ES 2 336 977 T3

5 fases de la fermentación debido a la toxicidad del etanol. El completamiento temprano de la fermentación maloláctica en el vino es de gran importancia para los vinateros, puesto que las operaciones en la bodega pueden comenzar inmediatamente para evitar la oxidación y el deterioro del vino. La aplicación de cepas malolácticas de *S. cerevisiae* puede evitar retrasos con el embotellamiento temprano y almacenamiento del vino, inmediatamente después de la fermentación alcohólica.

10 Habiendo ilustrado y descrito los principios de la invención en una forma de realización preferida, aquellos expertos en la materia deben apreciar que la invención se puede modificar en el orden y los detalles sin apartarse de esos principios. Nosotros reivindicamos todas las modificaciones que entren dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

15 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad en el mismo grado que si se indicase específica e individualmente que cada publicación, patente o solicitud de patente individual se incorporase por referencia en su totalidad.

A continuación se exponen citas completas para algunas de las referencias mencionadas en la memoria descriptiva, y se proporcionan leyendas detalladas para algunas de las Figuras.

20 La solicitud contiene el listado de secuencias que forman parte de la solicitud.

TABLA 1

Construcciones usadas para diseñar por ingeniería genética una vía de degradación del malato en S. cerevisiae YPH259 (19)

25

Nombre de la construcción	Descripción	Cepa recombinante
pHVX1	Vector lanzadera YEplac181 (18), que contiene el cassette de expresión ADH1 _p -ADH1 _t	YADH
pHVX2	Vector lanzadera YEplac181 que contiene el cassette de expresión PGK1 _p -PGK1 _t	YPGK
pHV1	pHVX1 con el ORF de <i>mae1</i> (ADH1 _p - <i>mae1</i> -adh1 _t)	YADH- <i>mae1</i>
pHV2	pHVX1 con el ORF de <i>mae2</i> (ADH1 _p - <i>mae2</i> -adh1 _t)	YADH- <i>mae2</i>
pHV3	pHVX2 con el ORF de <i>mae1</i> (PGK1 _p - <i>mae1</i> -PGK1 _t)	YPGK- <i>mae1</i>
pHV4	pHVX2 con el ORF de <i>mae2</i> (PGK1 _p - <i>mae2</i> -PGK1 _t)	YPGK- <i>mae2</i>
pHV5	Combinación de pHV1 y pHV4 para dar un vector basado en YEplac181 que contiene el sistema de expresión ADH1 _p - <i>mae1</i> -ADH1 _t /PGK1 _p - <i>mae2</i> -PGK1 _t	MAL1
pHV6	Combinación de pHV2 y pHV3 para dar un vector basado en YEplac181 que contiene el sistema de expresión ADH1 _p - <i>mae2</i> -ADH1 _t /PGK1 _p - <i>mae1</i> -PGK1 _t	MAL2

65

ES 2 336 977 T3

TABLA 2

Diferentes cepas y plásmidos empleados en la construcción genética de cepas malolácticas de S. cerevisiae

Cepas	Descripción	Ref.
<i>E. coli</i> JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 [r _{k-1} m _k ⁺], relA1, supE44, λ ⁻ , Δ(lac-proAB), [F ¹ , traD36, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q ZΔM15]	
<i>S. cerevisiae</i>	α ura3-52, lys2-801 ^{amber} , ade2-101 ^{ochre} , his3Δ200, leu2-Δ1	Sikorski y Hieter, 1989
Plásmidos		
PHVX2	Vector de expresión que sólo contiene las secuencias promotoras y terminadoras de PGK1	Figura 15
pHV3	Plásmido episomal multicopia que contiene el ORF de <i>mae1</i> insertado entre las secuencias promotoras y terminadoras de PGK1	Figura 15
pMDMALO	Plásmido episomal multicopia que contiene el ORF de <i>mleS</i> insertado entre las secuencias promotoras y terminadoras de PGK1	Denayrolles y col., 1995

Citas completas para las referencias mencionadas en la memoria descriptiva

Referencias

(Estas referencias se incorporan en el presente documento por referencia a ellas).

1. C. Gao, G. H. Fleet, *Food Microbiol.* 12, 65 (1995).
2. H. J. J. van Vuuren, L. M. T. Dicks, *Aro. J. Enol. Vitic.* 44, 99 (1993).
3. C. R. Davies, W. Wibowo, R. Eschenbruch, T. H Lee, G. H. Fleet, *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290 (1985).
4. R. E. Kunkee, *FEMS Microbiol. Rev.* 88, 55 (1991).

ES 2 336 977 T3

5. R. B. **Beelman**, J. F. **Gallander**, *Adv. Food Res.* 25, 1 (1979).
6. J. F. **Gallander**, *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 65 (1977).
- 5 7. F. **Radler**, In *Wine Microbiology and Biotechnology*, G. H. Fleet, Ed. (Chur, Harwood Academic, 1993), pp. 165-182.
8. E. **Fuck**, G. **Stark**, F. **Radler**, *Arch. Mikrobiol.* 89, 223 (1973).
- 10 9. A. **Temperli**, V. **Kunsch**, K. **Mayer**, I. **Busch**, *Biochem. Biophys. Acta.* 110, 630 (1965).
10. S. B. **Rodriquez**, R. J. **Thornton**, *FEMS Microbiol. Lett.* 72, 17 (1990).
11. M. **Denayrolles**, M. **Aigle**, A. **Lonvaud-Funel**, *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 37 (1995).
- 15 12. S. A. **Williams**, R. A. **Hodges**, T. L. **Strike**, R. **Snow**, R. E. **Kunkee**, *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 288 (1984).
13. J. **Grobler**, F. **Bauer**, R. E. **Subden**, H. J. J. van **Vuuren**, *Yeast* 11, 1485 (1996).
- 20 14. E. **Maconi**, P. **Manachini**, F. **Aragozzini**, C. **Gennari**, G. **Ricca**, *Biochem. J.* 217, 585 (1984).
15. R. D. **Gietz**, A. **Sugino**, *Gene* 74, 527 (1988).
16. R. S. **Sikorski**, P. **Hieter**, *Genetics* 122, 19 (1989).
- 25 17. B. **Martineau**, T. **Henick-Kling**, T. **Aeree**, *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 385 (1995).
18. D. C. **Burke**, *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement* 79, 1 (1995).
- 30 19. R. B. **Boulton**, V. L. **Sinleton**, L. F. **Bisson** y R. E. **Kunkee**, Malolactic fermentation, In *Principies and practices of winemaking*, pp. 244-273 (1996).
20. E. **Carre**, S. **Lafon-Lafourcade**, A. **Bertrand**, *Connaissance de la Vigne et du Vin* 17, 43-53 (1983).
- 35 21. J. M. **Crous**, I. S. **Pretorius** y W. H. Van **Zyl**, *Curr. Genet* 28 467-473 (1995).
22. M. **Denayrolles**, M. **Aigle** y A. **Lonvaud-Funel**, *FEMS Microbiol. Lett.* 116, 79-86, (1994).
23. T. **Henick-Kling**, In *Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 289-326, Switzerland: Harwood Academic Publishers (1993).
- 40 24. R. E. **Kunkee**, *Adv. Appl. Microbiol.* 9, 235-79 (1974).
25. A. **Lautensach** y R. E. **Subden**, *E. coli. Microbios.* 39, 29-39 (1984).
- 45 26. K. **Mayer** y A. **Temperli**, *Arch. Mikrobiol.* 46, 321-328 (1963).
27. M. J. **Sousa** y C. **Leao**, *Yeast*, 8, 1025-1031 (1992).
- 50 28. **Alfa**, C., **Fantes**, P., **Hyams**, J., **McLeod**, M. y **Warbrick**, E. (1993). In: *Experiments with fission yeast: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, USA. pp 1-186.
29. **Altschul**, S. F., **Gish**, W., **Miller**, W., **Myers**, E. W. y **Lipman**, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- 55 30. **Ansanay**, V., **Dequin**, S., **Blondin**, B. y **Barre**, P. (1993). Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. *FEBS Lett.* 332, 74-80.
31. **Baranowski**, K. y **Radler**, F. (1984). The glucose-dependant transport of L-malic acid in *Zygosaccharomyces bailii*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 50, 329-340.
- 60 32. **Beach**, D., **Piper**, M. y **Nurse**, P. (1982). Construction of a *Schizosaccharomyces pombe* gene bank in a yeast shuttle vector and its use to isolate genes by complementation. *Mol. Gen. Genet.* 187, 326-329.
- 65 33. **Bisson**, L. F., **Coons**, D. M., **Kruckeberg**, A. L. y **Lewis**, D. A. (1993). Yeast sugar transporters, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 259-308.

ES 2 336 977 T3

34. **Cassio, F. y Leao, C. (1993)**. A comparative study on the transport of L(-) malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: Evidence for a general organic acid permease. *Yeast* 9, 743-752.
35. **Corte-Real, M. y Leao, C. (1990)**. Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1109-1113.
36. **Corte-Real, M. y Leao, C. y Van Uden, N. (1989)**. Transport of L-malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida sphaerica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 551-555.
37. **Davey, J. (1992)**. Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone. *EMBO J.* 11, 951-960.
38. **Denayrolles, M., Aigle, M. y Lonvaud-Funel, A. (1995)**. Functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the *Lactococcus lactis* *mleS* gene encoding the malolactic enzyme. *FEMS Lett.* 125, 37-44.
39. **Devereux, J., Haerberli, P. y Smithies, O. (1984)**. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12, 387-395.
40. **Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. y Wall, R. (1984)**. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179, 125-142.
41. **Hoffman, W. (1985)**. Molecular characterization of the CAN1 locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 260, 11831-11837.
42. **Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982)**. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Biol. Chem.* 157, 105.
43. **Landschulz, W. H., Johnson, P. F. y McKnight, S. L. (1988)**. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
44. **Lee, S. y Rasheed, S. (1990)**. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *BioTechniques* 9, 676-679.
45. **Osothsilp, C. (1987)**. Ph.D. thesis, University of Guelph, Ontario, Cañada.
46. **Osothsilp, C. y Subden, R. E. (1986a)**. Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants with defective NAD-dependant malic enzyme. *Can J. Microbiol.* 32,481-486.
47. **Osothsilp, C. y Subden, R. E. (1986b)**. Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 168, 1439-1443.
48. **Prentice, H. L. (1992)**. High efficiency transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 20, 621.
49. **Radler, F. (1993)**. Yeast-metabolism of organic acids. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Ed. G. H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Australia, p.p. 165-182.
50. **Rao, M. J. K. y Argos, P. (1986)**. A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta* 869, 197-214.
51. **Rodrigues, S. B. y Thorton, R. J. (1990)**. Factors influencing the utilisation of L-malate by yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 72, 17-22.
52. **Rogers, S., Wells, R. y Rechsteiner, M. (1986)**. Amino acid sequence common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.
53. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989)**. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.
54. **Sikorski, R. S. y Hieter, P. (1989)**. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
55. **Sousa, M. J., Mota, M. y Leao, C. (1992)**. Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for a protondicarboxylate symport. *Yeast* 8, 1025-1031.
56. **Tabor, S. y Richardson, C. (1987)**. DNA sequence analysis with modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.

57. **Tschumper, G. y Carbón, J. (1980).** Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. *Gene* 19, 1157-1166.
58. **Tschopp, J. F., Emr, S. D., Field, C. y Schekman, R. (1986).** GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 166, 31.
59. **Viljoen, M., Subden, R. E., Krizus, A. y Van Vuuren, H. J. J. (1994).** Molecular analysis of the malic enzyme gene (*mae2*) of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 10, 613-624.
60. **White, M. K. y Weber, M. J. (1989).** Leucine zipper motif update. *Nature* (London) 340, 103-104.
61. **Williams, S. A., Hodges, R. A., Strike, T. L., Snow, R. y Kunkee, R. E. (1984).** Cloning the gene for the malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbrueckii* in *Escherichia coli* and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 288-293.
62. **Carrau, J. L. y col., 1982, Rev. Brasil. Genet.** 1: 221-226.
63. **Fernandez, M. J. y col., 1967, Eur. J. Biochem.** 3: 11-18.
64. **Goto, S., y col., 1978, Hakkokogaku,** 56: 133-135.
65. **Kuczynski, J. T. y F. Radler, 1982, Arch. Microbiol.** 131: 266-270.
66. **Svoboda, A., 1980.** Intergeneric fusión of yeast protoplast: *Saccharomyces cerevisiae* & *Schizosaccharomyces pombe*. In *Advances in protoplast research*. Editado por H. Szeged. Pergamon Press. Oxford, Toronto, pp 119-124.

Leyendas de las Figuras detalladas para las Figs. 1 a 15

- Figura 1. Transferencia cromosómica del gen *mae1*. Los cromosomas de *S. pombe* se separaron sobre un gel de CHEF (izquierda) y se probaron con una sonda con el fragmento Nsi1/Xho1 interno marcado de *mae1* (derecha).
- Figura 2. Mapa de restricción y estrategia de secuenciación del ADN para la región codificante y 3' del gen *mae1* y del gen *MFm1*. Solamente se muestran los sitios de restricción únicos que se producen dentro del gen *mae1*. Los fragmentos de la exonucleasa solapados se generaron para la secuenciación como se indica por las flechas. Ambas hebras del gen *mae1* se secuenciaron completamente mientras que sólo se secuenció una hebra del gen *MFm1*.
- Figura 3. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen *mae1*. Los nucleótidos están numerados a la izquierda, y los aminoácidos, designados por el código estándar de una sola letra, están numerados a la derecha. Las flechas que conectan los residuos 421 y 434 encierran una secuencia PEST; la serina y la treonina marcadas con un círculo son los sitios de fosforilación potenciales de la secuencia PEST. Los segmentos putativos que se extienden a través de la membrana se muestran en forma de cajas sólidas. Las asparaginas (N) marcadas con un círculo son posibles sitios de glicosilación. Las estrellas indican una cremallera de leucinas putativa. En el extremo 5' la caja "TATA" putativa está subrayada.
- Figura 4. Diagrama de hidropatía de la proteína *mae1* predicha. El perfil se determinó mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) usando una ventana de 10 aa.
- Figura 5. Modelo que muestra la distribución propuesta de los dominios de membrana hidrófobos que están numerados del 1 al 10. Los sitios de N-glicosilación (Y), el patrón de cremallera de leucinas (que conecta los dominios 6 y 7) y la región PEST (cilindro abierto próximo al extremo -COOH) están indicados sobre un modelo. El modelo se construyó a partir del análisis de la proteína *mae1* usando los métodos de Eisenburg y col. (1984) y Rao y Argos (1986).
- Figura 6. Transferencia de Northern del ARN total de *S. pombe* de tipo silvestre, probada con una sonda con el fragmento Nsi1/Xho1 de *mae1* de 695 pb. Las células se crecieron en glucosa (1), fructosa (2), fructosa tamponada con succinato 10 mM a pH 6,0 (3) o rafinosa (4) como única fuente de carbono.
- Figura 7. Captación de [¹⁴C] ácido L-málico (a) y [¹⁴C] ácido succínico (b) por el tipo silvestre (Δ), el mutante *mae1*- (○) y el mutante complementado (□). El transporte del ácido L-málico y el ácido succínico por el mutante fue completamente restaurado mediante la transformación de las células con el gen *mae1*. Se obtuvieron resultados similares cuando se usó [¹⁴C] ácido malónico (datos no mostrados).
- Figura 8. (A) *S. cerevisiae* no puede degradar eficazmente el malato debido a la ausencia de un transportador de malato y una enzima málica con una baja afinidad por el sustrato ($K_m = 50$ mM). (B) En contraste, *S. pombe* degrada el malato activamente puesto que esta levadura contiene una permeasa para el malato y otros ácidos dicarboxílicos C₄. Además, la afinidad por el sustrato de la enzima málica de *S. pombe* es considerablemente superior que la de la enzima de *S. cerevisiae*.

ES 2 336 977 T3

Figura 9. Captación de ^{14}C L-malato por cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contienen el gen *mae1* de *S. pombe* bajo la regulación (A) del promotor de PGK1 y (B) el promotor de ADH1, según Grobler y col. (14). Las células se cultivaron hasta una $\text{DO}_{600} = 0,6$ en un medio de glucosa al 2%, que contiene el 0,17% de base nitrogenada de levadura [sin aminoácidos y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] y el 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el 0,002% de adenina, uracilo e histidina y el 0,003% de lisina.

Figura 10. Degradación del malato por las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contienen los genes *mae1* y/o *mae2* de *S. pombe* en medio glicerol-etanol al 2% que contiene 8-9 g/l de L-malato. El medio de glicerol/etanol y el medio de glucosa se suplementaron como se indica en la Figura 9. La concentración de malato durante la fermentación se midió enzimáticamente con el kit de prueba 1-malic Acid Test Kit de Boehringer Mannheim. La degradación del malato se consideró completa cuando la concentración alcanzó los 0,3 g/l de L-malato (en este punto durante la vinificación se consideró que la fermentación maloláctica se había completado).

Figura 11. Degradación del malato mediante las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que contienen los genes *mae1* y/o *mae2* de *S. pombe* en medio glucosa al 2% que contiene 8-9 g/l de L-malato. El medio de glicerol/etanol y el medio de glucosa se suplementaron como se indica en la Figura 9. La concentración de malato durante la fermentación se midió enzimáticamente con el kit de prueba 1-malic Acid Test Kit de Boehringer Mannheim. La degradación del malato se consideró completa cuando la concentración alcanzó los 0,3 g/l de L-malato (en este punto durante la vinificación se consideró que la fermentación maloláctica se había completado).

Figura 12. Degradación del L-malato en mosto de uva Cabernet Sauvignon mediante cepas recombinantes de *S. cerevisiae*. La degradación del malato se consideró completa cuando la concentración alcanzó los 0,3 g/l de L-malato (Martineau y col., 1995). La cepa MLF1 de *S. cerevisiae* que contiene el gen de la malato permeasa (*mae1*) de *S. pombe* y el gen maloláctico (*mleS*) de *L. lactis* degradó completamente el L-malato en el mosto de uva Cabernet Sauvignon. El malato no fue degradado por las levaduras control que contienen el cassette de expresión de PGK1 (pHVX2) o el gen *mleS* (pMDMALO) o el gen *mae1* (pHV3) individualmente.

Figura 13. Degradación del L-malato en mosto de uva Chardonnay mediante cepas recombinantes de *S. cerevisiae*. La degradación del malato se consideró completa cuando la concentración alcanzó los 0,3 g/l de L-malato (Martineau y col., 1995). La cepa MLF1 de *S. cerevisiae* que contiene el gen de la malato permeasa (*mae1*) de *S. pombe* y el gen maloláctico (*mleS*) de *L. lactis* degradó completamente el L-malato tanto en el mosto de uva Cabernet Sauvignon como Chardonnay. El malato no fue degradado por las levaduras control que contienen el cassette de expresión de PGK1 (pHVX2) o el gen *mleS* (pMDMALO) o el gen *mae1* (pHV3) individualmente.

Figura 14. La fermentación maloláctica mediante las cepas de levadura recombinantes de *S. cerevisiae* en vinos Cabernet Sauvignon (A) y Chardonnay (B) después de la fermentación. Los carriles A3 y B3 corresponden al mosto fermentado con MLF1. Los carriles uno y dos (A y B) corresponden a la levadura control que contiene sólo el cassette de expresión de PGK1 (pHVX2) o el gen *mleS* (pMDMALO), respectivamente.

Figura 15. Subclonación del ORF de *mae1* de *S. pombe* bajo el control de las secuencias promotoras y terminadoras de PGK1 en pHVX2, un derivado de Yeplac181 (Sikorski y Hieter, 1989).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácidos nucleicos aislada, que comprende

5 (i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o en la Figura 3;

(ii) secuencias de ácidos nucleicos complementarias a (i);

10 (iii) secuencias de ácidos nucleicos capaces de hibridarse en condiciones rigurosas a un ácido nucleico de (i), que codifica una malato permeasa eucariota de *S. pombe* que media en la captación de L-malato, succinato, y malonato.

15 2. Una molécula de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 1 en la que la proteína contiene una región PEST, y un motivo de cremallera de leucinas.

20 3. Una molécula de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 1 que comprende

(i) una secuencia de ácidos nucleicos según la SEQ ID NO: 1 o la Figura 3, en la que la T también puede ser U;

25 (ii) secuencias de ácidos nucleicos complementarias a (i), preferentemente complementarias a la secuencia de ácidos nucleicos de longitud completa mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la Figura 3;

(iii) una secuencia de ácidos nucleicos capaz de hibridarse en condiciones rigurosas a un ácido nucleico de (i), o

30 (iv) una secuencia de ácidos nucleicos que difiere de cualquiera de los ácidos nucleicos de (i) a (iii) en las secuencias del codón debido a la degeneración del código genético.

35 4. Una sonda de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 1, que codifica al menos 6 ácidos nucleicos secuenciales a partir de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la Figura 3.

5. Un procedimiento de aislamiento de un ácido nucleico según la reivindicación 1 que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico que contiene la muestra con una sonda según la reivindicación 4 en condiciones que permiten la hibridación de la sonda con una molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 1, si está presente en la muestra, y el aislamiento de la molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 1.

40 6. Un vector de expresión recombinante adaptado para la transformación de una célula hospedadora que comprende una molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

45 7. Una célula hospedadora eucariota transformada con un vector de expresión recombinante según la reivindicación 6.

8. Una célula hospedadora eucariota según la reivindicación 7, dicha célula que tiene integrado en su genoma dicha molécula de ácidos nucleicos.

50 9. Una célula hospedadora eucariota que tiene integrado en su genoma una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión comprende la malato permeasa codificada por la molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y una enzima maloláctica.

55 10. Una célula hospedadora eucariota que tiene integrado en su genoma una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión comprende la malato permeasa codificada por la molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y una enzima málica.

60 11. Una célula eucariota transformada con una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión comprende la malato permeasa codificada por la molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y una enzima maloláctica.

12. Una célula eucariota transformada con una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión comprende la malato permeasa codificada por la molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y una enzima málica.

65 13. Una célula de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 en la que la célula degrada el L-malato durante la fermentación alcohólica.

ES 2 336 977 T3

14. Una célula de *Saccharomyces* según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en la que la célula degrada el L-malato durante la fermentación alcohólica del vino.
15. Una célula de levadura según la reivindicación 9 u 11, en la que la célula es útil en la degradación del L-malato a L-lactato y CO₂ durante la fermentación alcohólica.
16. Una célula de levadura según la reivindicación 10 ó 12, en la que la célula es útil en la degradación del L-malato a etanol y CO₂ durante la fermentación alcohólica.
17. Una célula eucariota según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 que es una célula de levadura.
18. Una célula eucariota según una cualquiera de las reivindicaciones 7 al 17 que es *Saccharomyces*.
19. Una célula eucariota según la reivindicación 18 que es *S. cerevisiae* o *S. bayanus*.
20. Un procedimiento de incremento de la captación de L-malato, ácido succínico o malonato en una célula que comprende la transformación de la célula con una molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
21. Un procedimiento para dotar a un microorganismo de la capacidad de degradar el malato que comprende la transformación del microorganismo con una molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
22. Un procedimiento según la reivindicación 20 ó 21, en el que el microorganismo es una cepa de levadura.
23. Un procedimiento de degradación del malato, que comprende el cultivo, en presencia de malato, de un microorganismo que ha sido transformado con una molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
24. Un procedimiento de degradación del malato que comprende el cultivo, en presencia de malato, de una célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 7 al 19.
25. Un procedimiento de degradación del malato durante la fermentación del vino, cuyo procedimiento comprende el cultivo, en mostos de uva que contienen malato, de una cepa de levadura según la reivindicación 17, 18 ó 19.
26. Un procedimiento de fermentación del vino, que incluye el cultivo, en un medio de fermentación del vino que incluye un mosto de uva que contiene malato, de una cepa de levadura según la reivindicación 17, 18 ó 19.
27. Un procedimiento según la reivindicación 22, 25 ó 26, en el que la cepa de levadura es una cepa de *Saccharomyces*.
28. Un procedimiento para la preparación de una proteína que media en la captación de L-malato, succinato y malonato, que comprende (a) la transferencia de un vector de expresión recombinante según la reivindicación 6 a una célula hospedadora; (b) la selección de las células hospedadoras transformadas entre las células hospedadoras no transformadas; (c) el cultivo de una célula hospedadora transformada seleccionada en condiciones que permiten la expresión de la proteína; y (d) el aislamiento de la proteína.
29. Una proteína aislada **caracterizada** porque está codificada por una molécula de ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
30. Una proteína aislada según la reivindicación 29, **caracterizada** porque tiene parte o toda la conformación estructural primaria y la actividad enzimática de la malato permeasa de *S. pombe*.
31. Una proteína aislada según la reivindicación 30, que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 o en la Figura 3.
32. Una proteína aislada según la reivindicación 29, 30 ó 31, que es un truncamiento de la proteína o una isoforma de la proteína y sus truncamientos, que tiene actividad malato permeasa.
33. Anticuerpos que tienen actividad específica contra un epítipo de una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32.
34. Un procedimiento para la detección de una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32, que comprende la puesta en contacto de una muestra con un anticuerpo según la reivindicación 33.

ES 2 336 977 T3

35. Un procedimiento para la identificación de una sustancia que media en el transporte del L-malato, succinato o malonato que comprende la incubación de una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 con un sustrato de la proteína, y una sustancia de prueba que se sospecha que afecta a la actividad de la proteína, y la determinación del efecto de la sustancia comparándola con un control.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

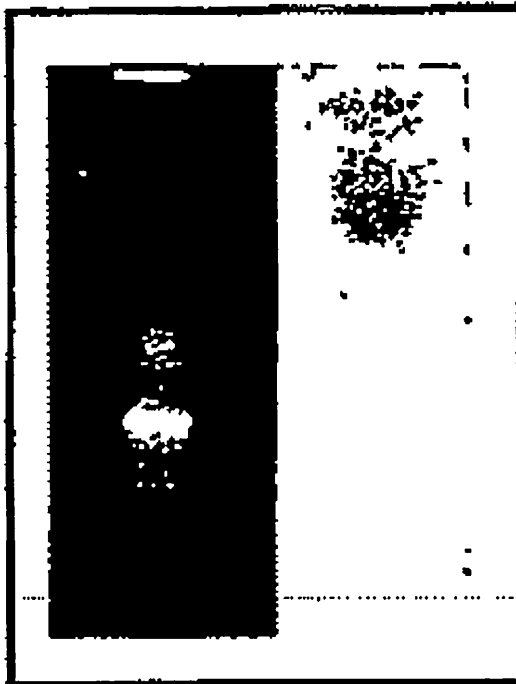


Figura 2

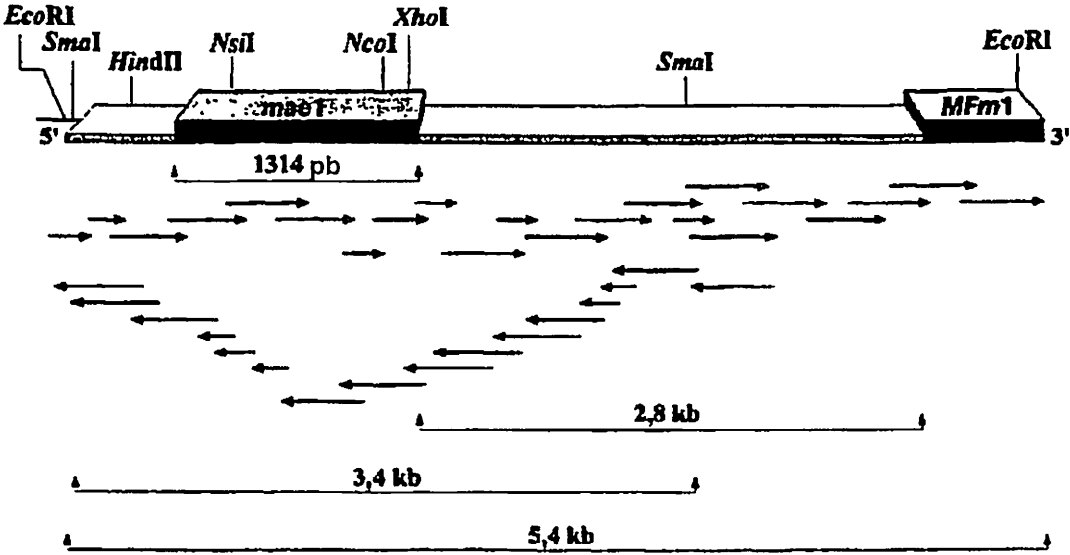


FIGURA 3

-378 TGATCACTATTGTTGTTCTATTTTGTCTTTCTTTTACTGTTTGTCTACACAAAATAAGCTTATTTGTTGCTGCACT
-300 AGACTTTTGTGTTGATTTCTCATCCTACTCTGTATCGGCAGTTGCTCATTACTAAGACTAGCAACAGCCAGTCATTCTTTTACACTCTCTATCA
-200 TTTTATTTTTCATCAGATAAACAATGATGCGATTGACTCAGATAAATGCTAGCAATGTTGCTCTTTCTCTCCGCTTTTCTTTTGTG
-100 TTCTTTTCTCCTTATATTAATTATATATATTCATTCTTCATTCTCTCTTTGGCCACTATTTTTTTTTTAATCCCTTTATCTCTCBAATCGAC
1 ATGGGTGAACCTCAAGGAACTTGAACAGAGGTATCATGAGTTGCTTGACTGSAATGTCAAAGCCCCCATGTCCTCTCAGTCAACGACTGAAGCATT
M G E L K E I L K Q R Y H E L L D W H V K A P H V P L S Q R L K H F 34
101 TTACATGGTCTTGGTTGTCATGTACTATGGCAACTGGTGGTGGTTGATTATIGGTTCTTTCCCTTTTCGATTTTATGTCCTTAATACAATGGCAA
T W S W F A C T M A T G G V G L I I G S F P F R F Y G L N T I G K 67
201 AATTGTTTATATTCCTCAATCTTTTGTCTCTCTTTGGATCATGCATGCTTTTCGCTTATTAATATCCTTCAACTATCAAGGATTCCTGGAAC
I V Y I L O I F L F S L F G S C M L F R F I K Y P S T I K D S W H 100
301 CATCATTGGAAAAGCTTTTCATTGCTACTTGTCTCTTTCATATCCACGCTCATCGACATGCTTGCATATACGCTATCCTGATACGGCGAGTGGAA
H H L E K L F I A T C L L S I S T F I D M L A I Y A Y P D T G E W H 134
401 TGGTGTGGTTCATTGCAATCCTTTATTACATTAAGTTGAGTATCCTTTATATACTGCTAATGGCTTTTTTACAATTTTCAACAACCATGATATATAC
V W V I R I L Y Y I V V A V S F I Y C V M A F F T I F H N H V Y T 167
501 CATTGAAACCGCATCTCTGCTTGGATTCTTCTTATTTTCCCTCCTATGATTGTTGGTGTGCTTGTGGCGCGTCAATTCACACAACCGCTCATCAA
I E T A S P A M I L P I F P P H I C G V I A G A Y N S T Q P A H Q 200
601 TTAATAATATGGTTATCTTTGGTATCCTCTTCAAGGACTTGGTTTGGGTTTATCTTTTACTGTTTGGCGTCAATGCTTACGGTTTTTACTGTAG
L K N H V I F G I L F Q G L G F W V Y L L L F A V H V L R F F T Y G 234
701 GCCTGGCAAAACCCCAAGATCGACCTGGTATGTTATGTTGTCGGTCCACAGCTTCTCAGGTTTGGCCTAATTAATATGGCGTGGTGTATGGG
L A K P Q D R P G M F M F V G P P A F S G L A L I N I A R G A M G 267
801 CAGTGCCTTATATTTTGTGGGCAACTCATCGAGTATCTGGTTTGTCTTACTCTTATGGCTATTTTTATTTGGGCTGTGCTGCTGGTGT
S R P Y I F V G A N S S E Y L G F V S T F M A I F I W G L A A W C 300
901 TACTGTCTCGCATGGTAGCTTTTACGGGCTTTTCTCACTCGAGCCCTCTCAAGTTGCTTGTGGATGGTTGCATTCAATTTCCCAACGTGGGT
Y C L A M V S F L A G F F T R A P L K F A C G W F A F I F P N Y G F 334
1001 TTGTTAATGTACCATTGAGATAGGTAATGATAGATCCAAAGCTTCCAAATGTTGGACATATCATTGGGGTCAATCTTTGATTCAGTGGATCCT
V N C T I E I G K M I D S K A F Q M F G H I I G V I L C I Q W I L 367
1101 CCTAATGTATTAAATGGTCCGTCGTTTCTCGTCAATGATCTTGTCTATCTGCAAGACGAAGATGCCATCTCCACCAAAACCAATACAGGTGTC
L M V L M V R A F L V N D L C Y P G K D E D A H P P P K P N T G V 400
1201 CTTAACCTACCTCCCACTGAAAAAGCACCTGCATCTTGGAAAAAGTGGATACACATGTCACATCTACTGGTGGTGAATCGGATCCTCTAGTAGTG
L N P T F P P E K A P A S L E K V D T H V T S T G G E S O P P S S E 434
1301 AACATGAAAGCGTTAAGCTGTATGCTTTCTTAATTTTCTATAAATCTGTGTCCTTCTTAATACCATTATAGATTAATCATTTGAATCATT
H E S V * 438
1401 CTGTATCTTATTGACTACTGTAATAATTTGCTTAGACATTTTGTCTCTTCTTCTTTTGTGTTAAATATACATACCAAAATTTGGACTTTG
1501 AATAATGGTAATTTTGGTGTGCTAGTGTAAATATGATGCGCTTGTGATATGATCAGCAGGAAGGAATCAATTAATAATCAATCCTGTACATAAT
1601 AAAATTAAGTTTATTTATTTTATTTTATTCGGATTAATCGTCAAAATTTATATCTTGGTCAATCAAGCTTATATCTCTTCTACTCTATCAGCAGCAC
1701 ACTTTAGTTATGGTTATTTGAAACTGTGTATAAATCTGTTTATAGAGAAATGAGTAAAGACAACAAAAAAGCTAGTCGGCATCGCATGT
1801 CTCAAACATATCTTGGCGTATTGATGAGEATCTTACACACTCACTATACGTAAACAATAAATTAAGAGGGATTTCATGACAAAAGAATACATAGAGTGA
1901 ACCACTATGACTAAAATAAAACTGATAAAGGTAATCTAAAATATTAATCATGTATAGAAAAATGTCCAATTAATCAAGATAGCGTTGAACGTGACC
2001 TGATACTAGATTGCACAAAGAAATAAAACAATCTTGAAGTAAAAGCAATAGCACAATAAAGAGAAGATACCTCATTAAAC

FIGURA 4

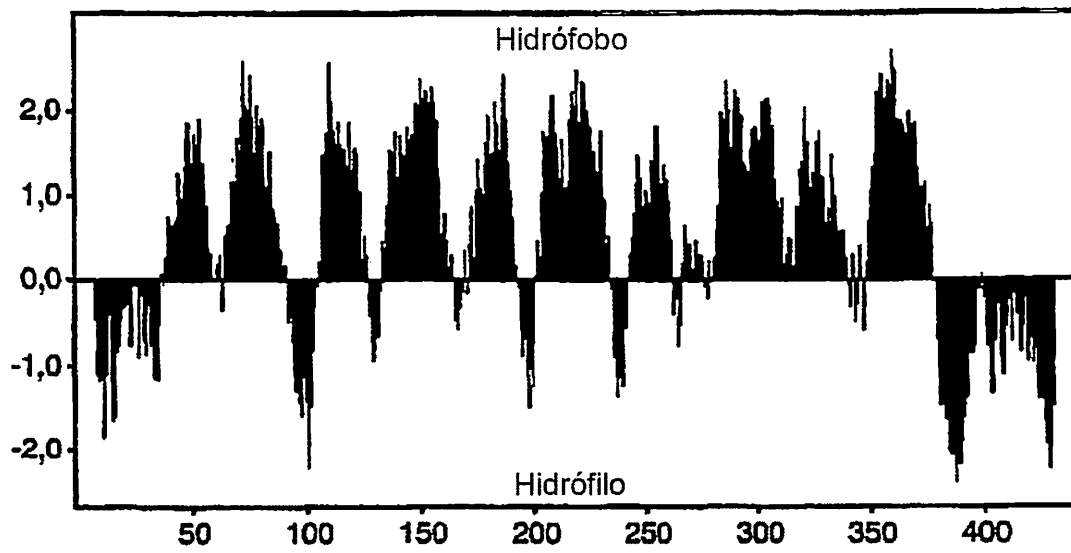


FIGURA 5

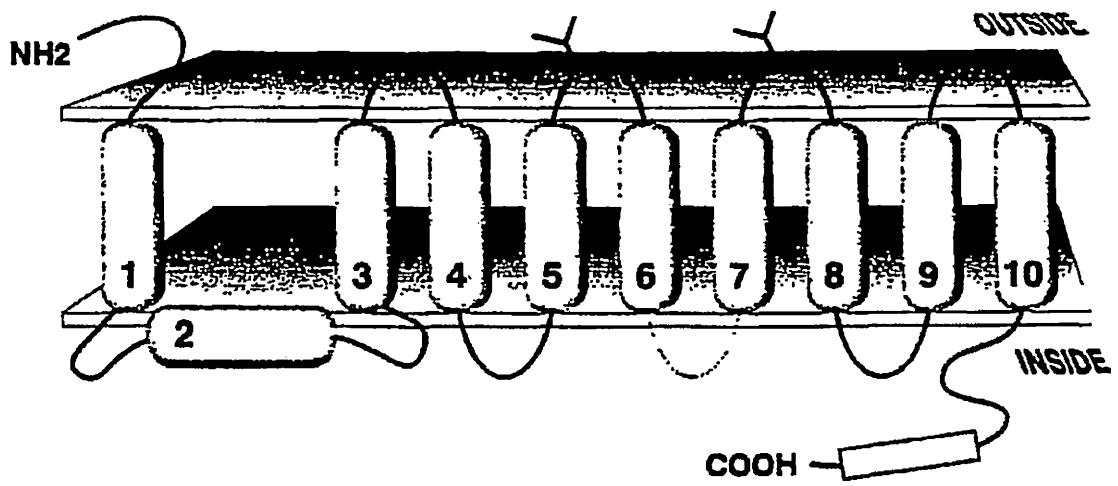


FIGURA 6

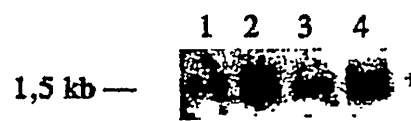


FIGURA 7

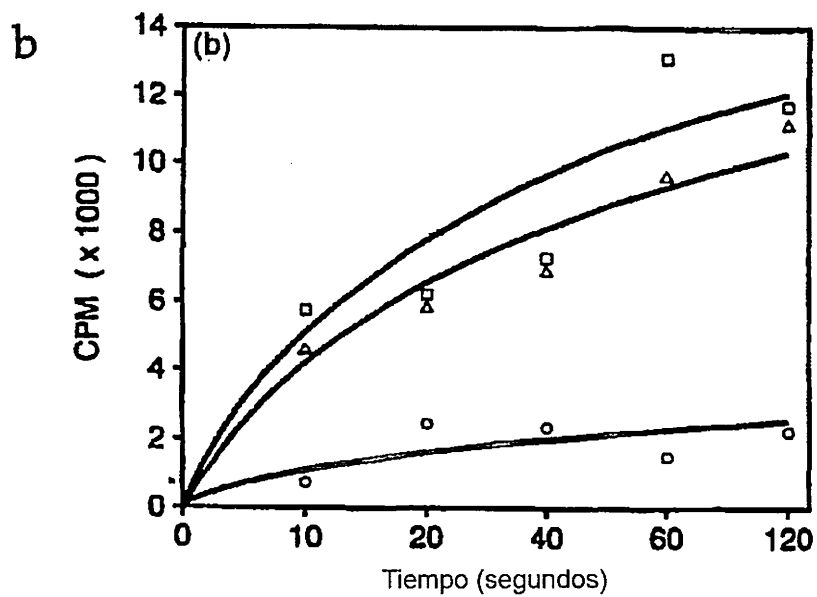
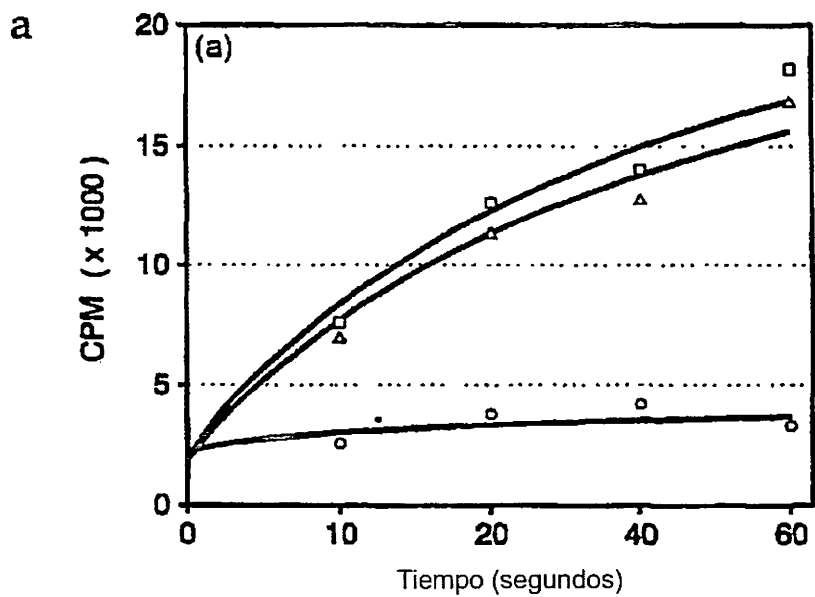


FIGURA 8

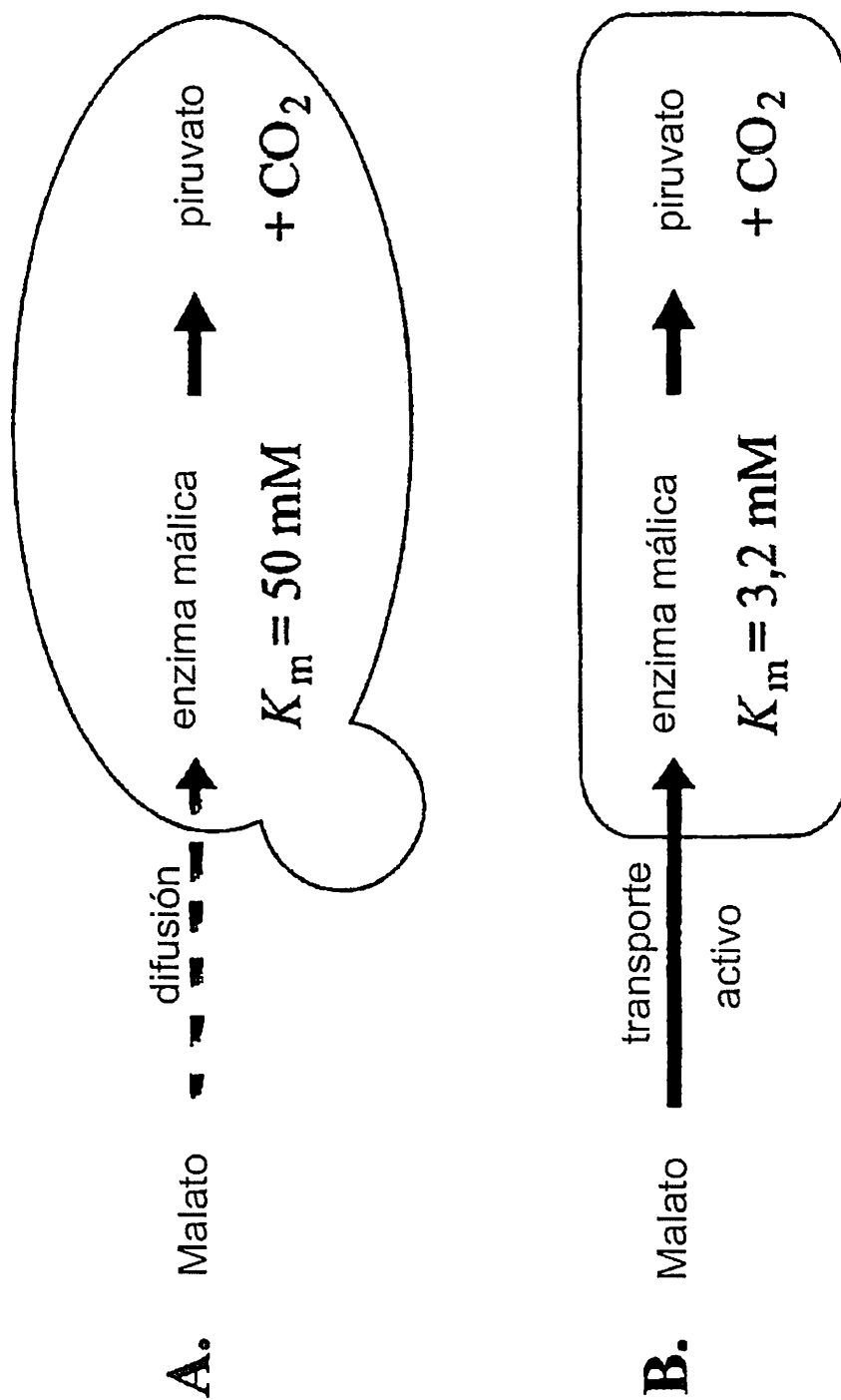


FIGURA 9

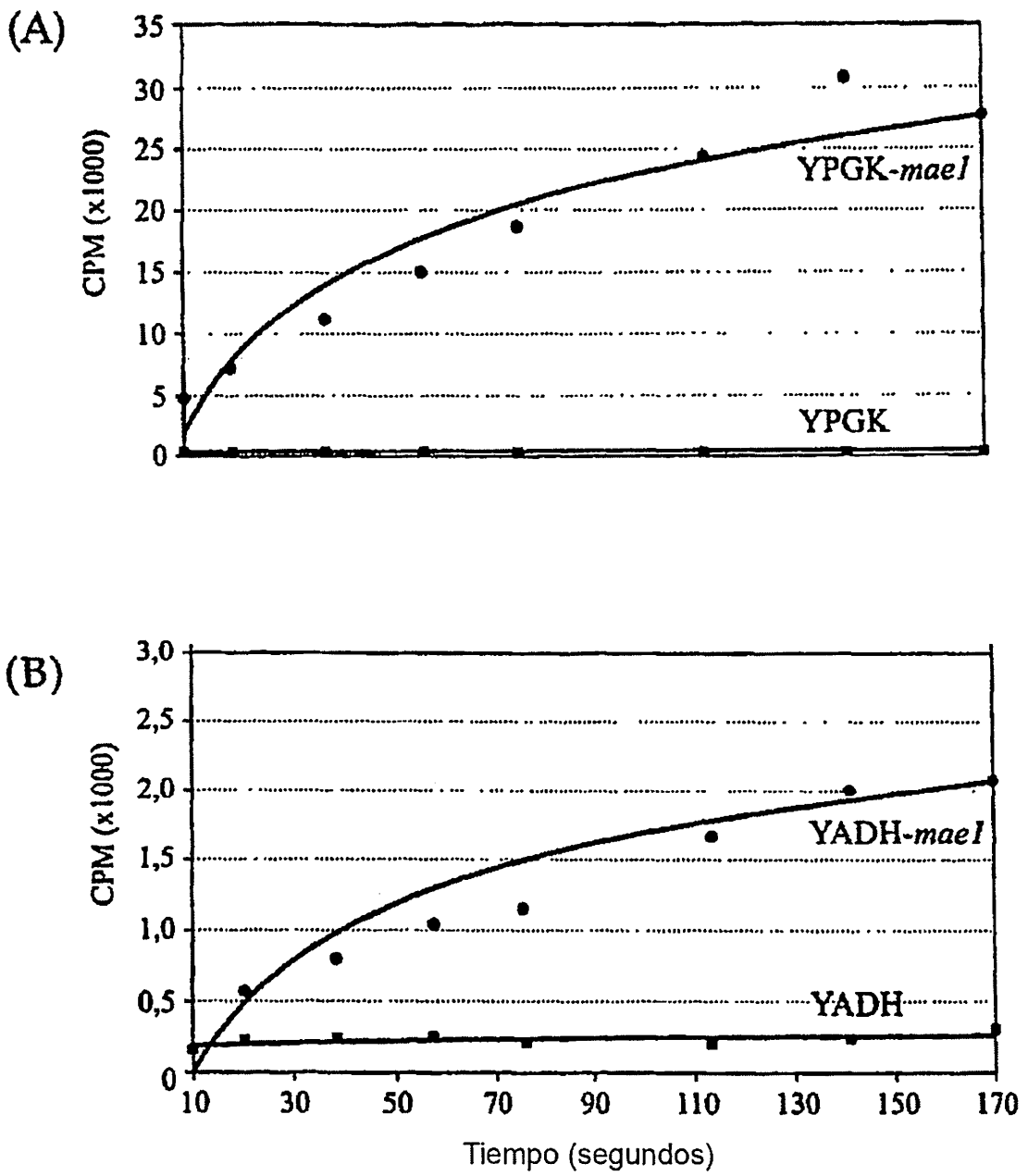


FIGURA 10

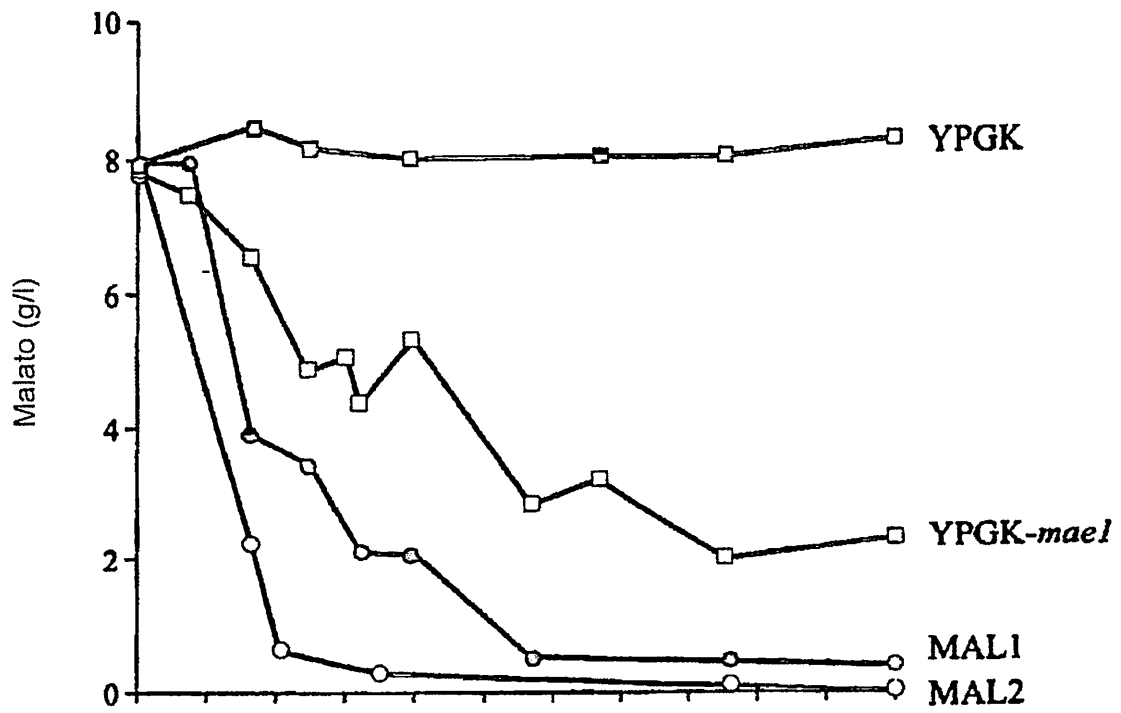


FIGURA 11

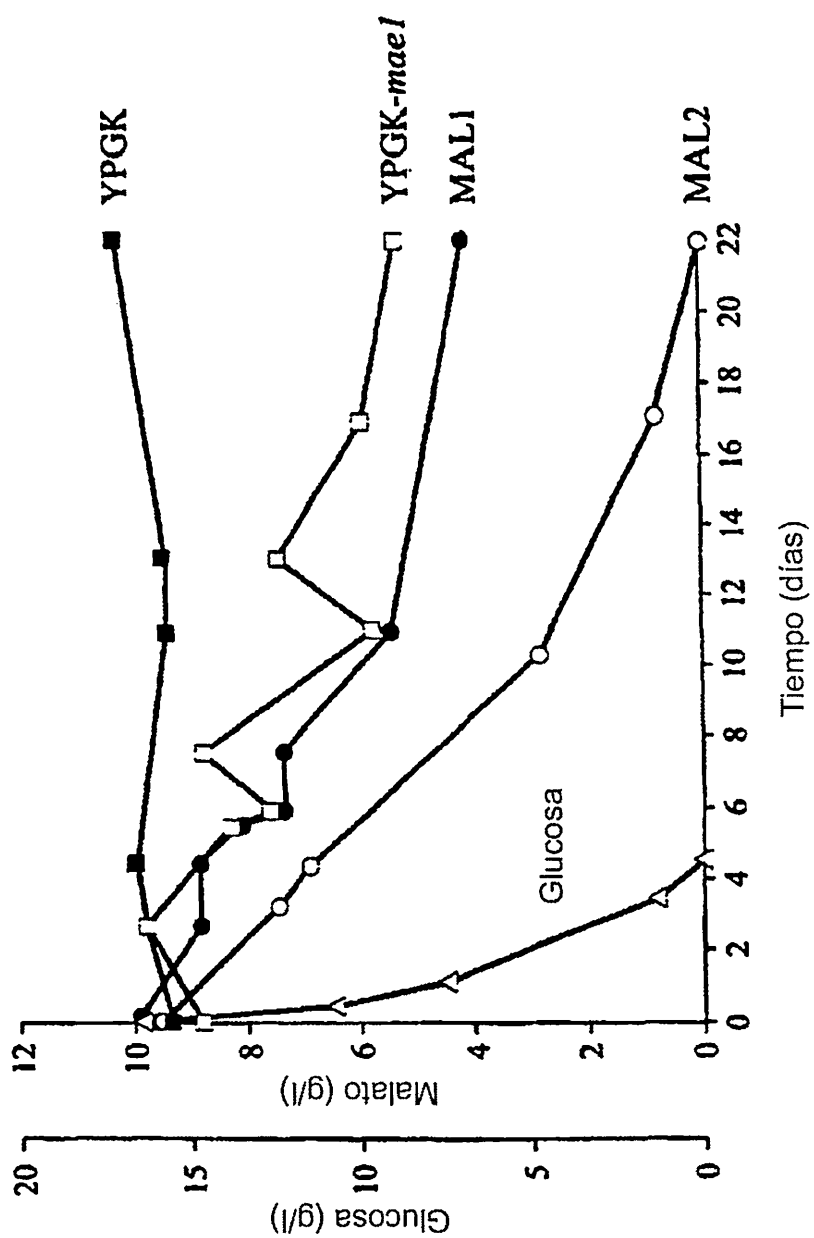


FIGURA 12

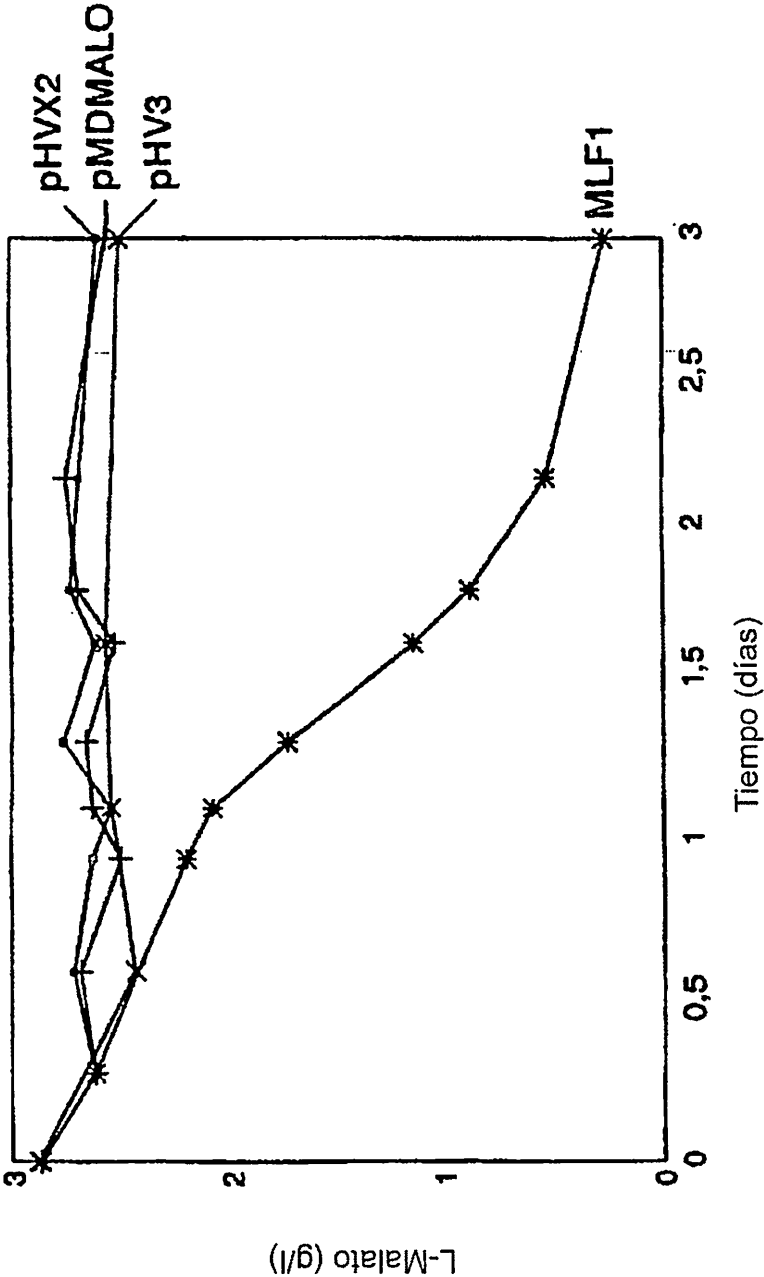


FIGURA 13

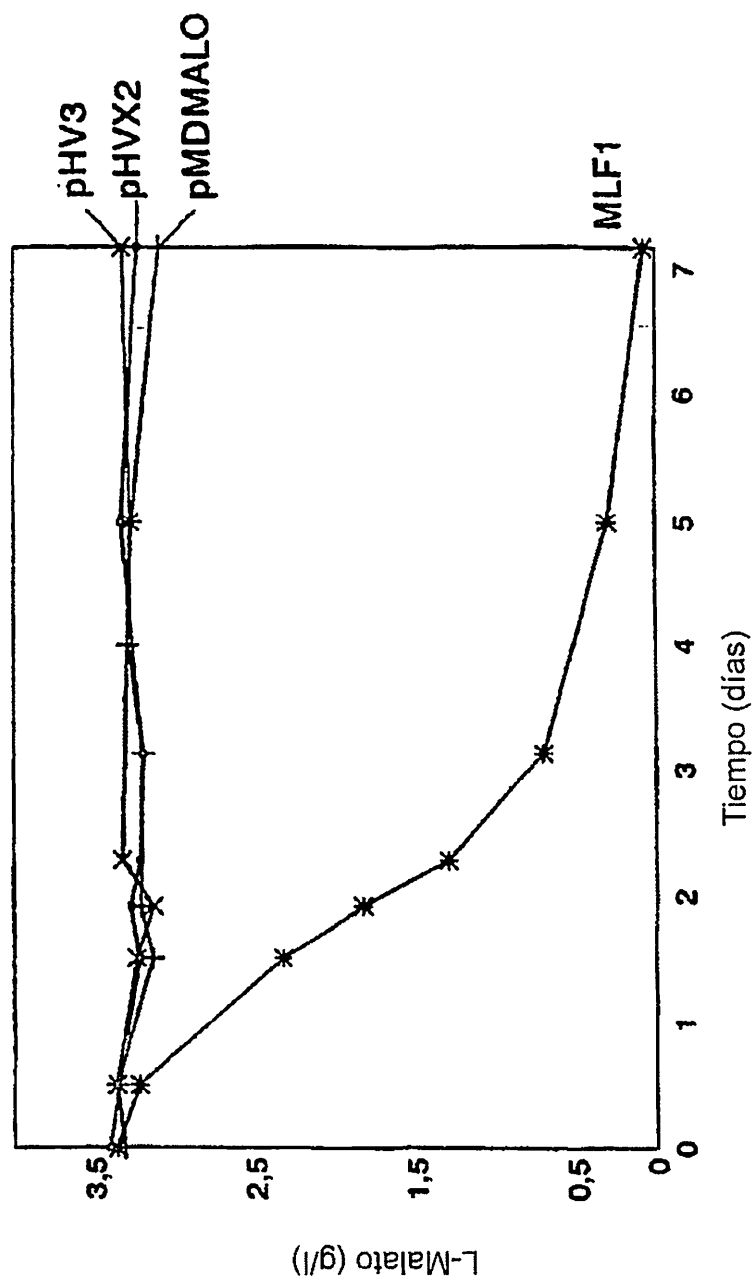


FIGURA 14

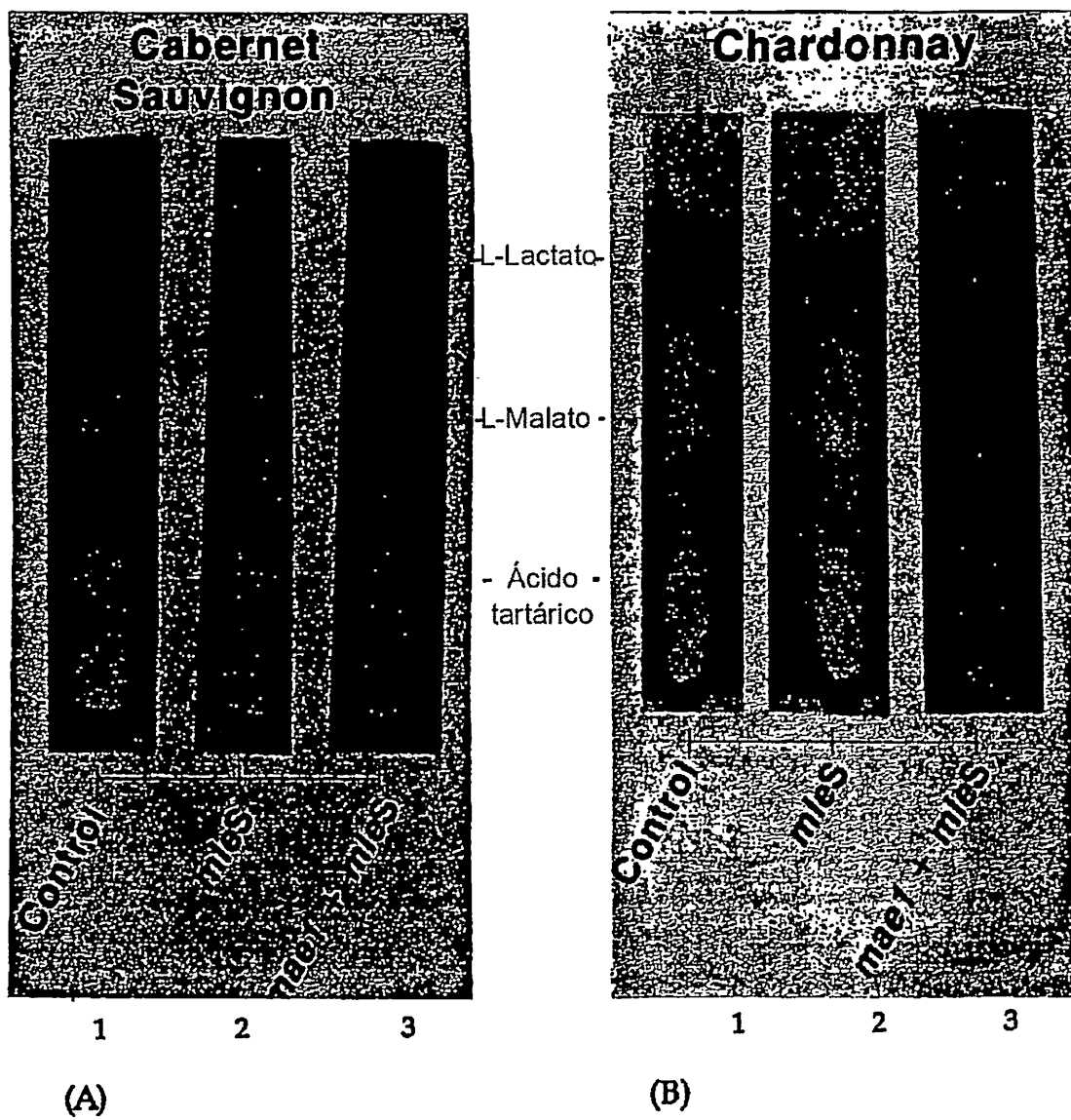
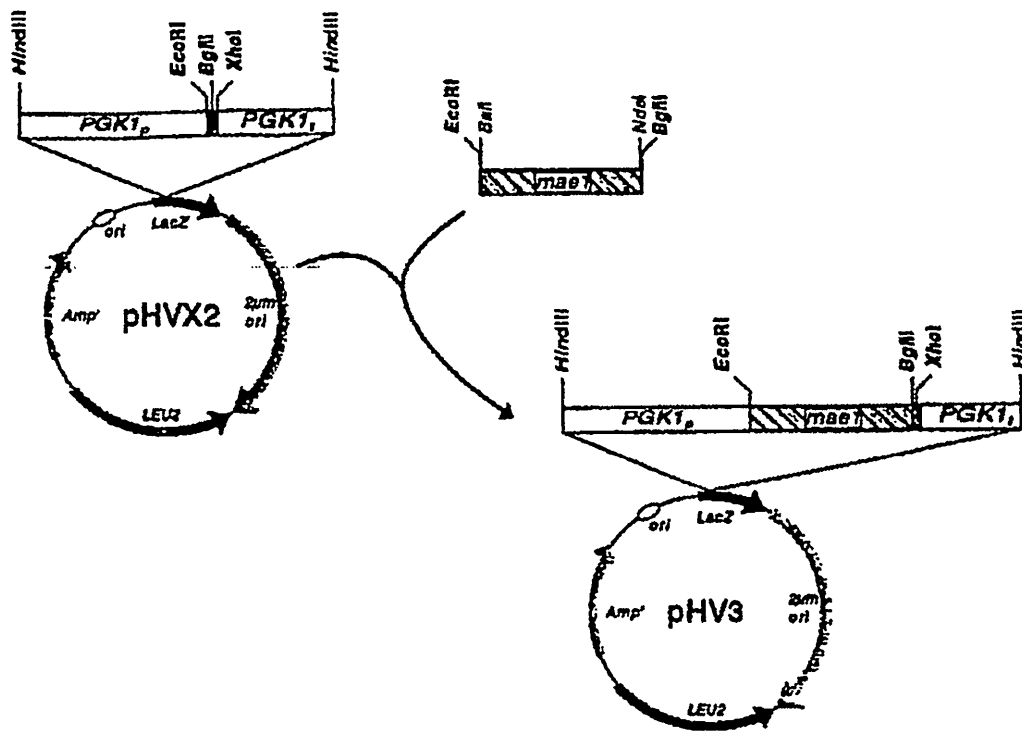


FIGURA 15



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Universidad de Stellenbosch
 - (B) CALLE: Victoria Street
 - 10 (C) CIUDAD: Stellenbosch 7600
 - (D) PAÍS: República de Sudáfrica
 - (E) N° DE TELÉFONO
 - (F) N° DE FAX
 - 15 (A) NOMBRE:
 - (B) CIUDAD:
 - (C) ESTADO:
 - 20 (D) PAÍS:
 - (E) CÓDIGO POSTAL:
 - (F) N° DE TELÉFONO:
 - 25 (G) N° DE FAX:
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Procedimiento y secuencia de nucleótidos para la transformación de microorganismos
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 8
- 30 (iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRECCIÓN:
 - (B) CALLE:
 - 35 (C) CIUDAD:
 - (D) ESTADO:
 - (E) PAÍS:
 - 40 (F) CÓDIGO POSTAL:
- (v) FORMA DE LECTURA EN ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 - 45 (B) ORDENADOR:
 - (C) SISTEMA OPERATIVO:
 - (D) SOFTWARE:
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 50 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- 55 (viii) INFORMACIÓN DEL PROCURADOR/AGENTE:
- (A) NOMBRE:
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO:
 - 60 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE:
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO:
 - 65 (B) TELEFAX:

ES 2 336 977 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2460 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Schizosaccharomyces pombe*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: Mae1

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

25	TGATCACTAT TTGTTTGTTTC TATTTTTGTTT TTCTTTTACT TGTTTGCTAC ACAAATAAG	60
	CTTATTTGTTT GCTGCACTAG ACTTTTTGTTT TGATTTCTCA TCCTACTTCT GTATCGGCAG	120
30	TTTGCTCATT TACTAAGACT AGCAACAGCC AGTCATTCA TTTTACACT CTCTATCATT	180
	TTTTATTTTC ATCACGATAA CTAACATGTG CGATTAGACT CACAGATAAA TTGCTAGCAA	240
	TTGGTTGTCT CTTTCCTTCC TCCGTCTTTT CCTTTTTGTTT CCTTTTTCTC CTTATATTAT	300
35	ATTATATTAT ATTCATTCTT CATTTCCTCT CTTGGCCACT ATTTTTTTTT TTAATCCCC	360
	TTTATCTCTC GATTCGAC ATG GGT GAA CTC AAG GAA ATC TTG AAA CAG AGG	411
	Met Gly Glu Leu Lys Glu Ile Leu Lys Gln Arg	
	1 5 10	
40	TAT CAT GAG TTG CTT GAC TGG AAT GTC AAA GCC CCT CAT GTC CCT CTC	459
	Tyr His Glu Leu Leu Asp Trp Asn Val Lys Ala Pro His Val Pro Leu	
	15 20 25	
45	AGT CAA CGA CTG AAG CAT TTT ACA TGG TCT TGG TTT GCA TGT ACT ATG	507
	Ser Gln Arg Leu Lys His Phe Thr Trp Ser Trp Phe Ala Cys Thr Met	

ES 2 336 977 T3

	30		35		40		
5	GCA ACT GGT GGT GTT GGT TTG ATT ATT GGT TCT TTC CCC TTT CGA TTT						555
	Ala Thr Gly Gly Val Gly Leu Ile Ile Gly Ser Phe Pro Phe Arg Phe	45	50	55			
10	TAT GGT CTT AAT ACA ATT GGC AAA ATT GTT TAT ATT CTT CAA ATC TTT						603
	Tyr Gly Leu Asn Thr Ile Gly Lys Ile Val Tyr Ile Leu Gln Ile Phe	60	65	70	75		
15	TTG TTT TCT CTC TTT GGA TCA TGC ATG CTT TTT CGC TTT ATT AAA TAT						651
	Leu Phe Ser Leu Phe Gly Ser Cys Met Leu Phe Arg Phe Ile Lys Tyr	80	85	90			
20	CCT TCA ACT ATC AAG GAT TCC TGG AAC CAT CAT TTG GAA AAG CTT TTC						699
	Pro Ser Thr Ile Lys Asp Ser Trp Asn His His Leu Glu Lys Leu Phe	95	100	105			
25	ATT GCT ACT TGT CTT CTT TCA ATA TCC ACG TTC ATC GAC ATG CTT GCC						747
	Ile Ala Thr Cys Leu Leu Ser Ile Ser Thr Phe Ile Asp Met Leu Ala	110	115	120			
30	ATA TAC GCC TAT CCT GAT ACC GGC GAG TGG ATG GTG TGG GTC ATT CGA						795
	Ile Tyr Ala Tyr Pro Asp Thr Gly Glu Trp Met Val Trp Val Ile Arg	125	130	135			
35	ATC CTT TAT TAC ATT TAC GTT GCA GTA TCC TTT ATA TAC TGC GTA ATG						843
	Ile Leu Tyr Tyr Ile Tyr Val Ala Val Ser Phe Ile Tyr Cys Val Met	140	145	150	155		
40	GCT TTT TTT ACA ATT TTC AAC AAC CAT GTA TAT ACC ATT GAA ACC GCA						891
	Ala Phe Phe Thr Ile Phe Asn Asn His Val Tyr Thr Ile Glu Thr Ala	160	165	170			
45	TCT CCT GCT TGG ATT CTT CCT ATT TTC CCT CCT ATG ATT TGT GGT GTC						939
	Ser Pro Ala Trp Ile Leu Pro Ile Phe Pro Pro Met Ile Cys Gly Val	175	180	185			
50	ATT GCT GGC GCC GTC AAT TCT ACA CAA CCC GCT CAT CAA TTA AAA AAT						987
	Ile Ala Gly Ala Val Asn Ser Thr Gln Pro Ala His Gln Leu Lys Asn	190	195	200			
55	ATG GTT ATC TTT GGT ATC CTC TTT CAA GGA CTT GGT TTT TGG GTT TAT						1035
	Met Val Ile Phe Gly Ile Leu Phe Gln Gly Leu Gly Phe Trp Val Tyr	205	210	215			
60	CTT TTA CTG TTT GCC GTC AAT GTC TTA CGG TTT TTT ACT GTA GGC CTG						1083
	Leu Leu Leu Phe Ala Val Asn Val Leu Arg Phe Phe Thr Val Gly Leu	220	225	230	235		
65	GCA AAA CCC CAA GAT CGA CCT GGT ATG TTT ATG TTT GTC GGT CCA CCA						1131
	Ala Lys Pro Gln Asp Arg Pro Gly Met Phe Met Phe Val Gly Pro Pro	240	245	250			
70	GCT TTC TCA GGT TTG GCC TTA ATT AAT ATT GCG CGT GGT GCT ATG GGC						1179
	Ala Phe Ser Gly Leu Ala Leu Ile Asn Ile Ala Arg Gly Ala Met Gly	255	260	265			
75	AGT CGC CCT TAT ATT TTT GTT GGC GCC AAC TCA TCC GAG TAT CTT GGT						1227
	Ser Arg Pro Tyr Ile Phe Val Gly Ala Asn Ser Ser Glu Tyr Leu Gly	270	275	280			
80	TTT GTT TCT ACC TTT ATG GCT ATT TTT ATT TGG GGT CTT GCT GCT TGG						1275
	Phe Val Ser Thr Phe Met Ala Ile Phe Ile Trp Gly Leu Ala Ala Trp	285	290	295			

ES 2 336 977 T3

TGT TAC TGT CTC GCC ATG GTT AGC TTT TTA GCG GGC TTT TTC ACT CGA 1323
 Cys Tyr Cys Leu Ala Met Val Ser Phe Leu Ala Gly Phe Phe Thr Arg
 300 305 310 315

5 GCC CCT CTC AAG TTT GCT TGT GGA TGG TTT GCA TTC ATT TTC CCC AAC 1371
 Ala Pro Leu Lys Phe Ala Cys Gly Trp Phe Ala Phe Ile Phe Pro Asn
 320 325 330

10 GTG GGT TTT GTT AAT TGT ACC ATT GAG ATA GGT AAA ATG ATA GAT TCC 1419
 Val Gly Phe Val Asn Cys Thr Ile Glu Ile Gly Lys Met Ile Asp Ser
 335 340 345

AAA GCT TTC CAA ATG TTT GGA CAT ATC ATT GGG GTC ATT CTT TGT ATT 1467
 Lys Ala Phe Gln Met Phe Gly His Ile Ile Gly Val Ile Leu Cys Ile
 350 355 360

15 CAG TGG ATC CTC CTA ATG TAT TTA ATG GTC CGT GCG TTT CTC GTC AAT 1515
 Gln Trp Ile Leu Leu Met Tyr Leu Met Val Arg Ala Phe Leu Val Asn
 365 370 375

20 GAT CTT TGC TAT CCT GGC AAA GAC GAA GAT GCC CAT CCT CCA CCA AAA 1563
 Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Lys Asp Glu Asp Ala His Pro Pro Pro Lys
 380 385 390 395

CCA AAT ACA GGT GTC CTT AAC CCT ACC TTC CCA CCT GAA AAA GCA CCT 1611
 Pro Asn Thr Gly Val Leu Asn Pro Thr Phe Pro Pro Glu Lys Ala Pro
 400 405 410

25 GCA TCT TTG GAA AAA GTC GAT ACA CAT GTC ACA TCT ACT GGT GGT GAA 1659
 Ala Ser Leu Glu Lys Val Asp Thr His Val Thr Ser Thr Gly Gly Glu
 415 420 425

30 TCG GAT CCT CCT AGT AGT GAA CAT GAA AGC GTT TAA GCTTGATGC 1705
 Ser Asp Pro Pro Ser Ser Glu His Glu Ser Val *
 430 435

TTTTCCTTAA TTTTCTATA AATCTGTGTG CCTGCTCTT AATACCATTA TAGATTAATC 1765

35 ATTTTGAATC ATTCTGTATC TTTATGTAC TACTGGTACT AATTTTGCTT AGACATTTTT 1825

GCTCCTTCTT CTTCTTTTTG TTTAAATAT ACATACCAA AATTTGGACT TTGAATAATG 1885

GTAATTTTTG GTTGTCTAG TGTAAATAT GTATGCGTCT TGCATATGAA TCACGACGAA 1945

40 GGAATCAATT AAAAAATCAA TCCTGTACAT AATAAAATTA AGTTTATTTA TTTCAATTTA 2005

TCGGATTTAA TCGTCTAAAA TTTATATCTT GGTCAACCAA GCTTATATCT CTTTCTACTC 2065

TTATCAGCAG CACACTTTAG TTATGGTTAT TTGAAAACCTT GTGTATAAAT TCCTGGTTAT 2125

45 AGAGAAAATG AGTATAAGAC AACAAAAAAA AGCCTAGTCG GCATGCGACA TGCTCAAAC 2185

ATATCTTTGG CGTATTGATG AGCATCTTAC AACTCACTA TACGTAACAA TAAAAATTAAG 2245

AGGGATTTCA TGACAAAAGA ATACTAGAGT GAAACCACTA TGACTAAAAT AAAAACTGGT 2305

50 AAAAGGTAAT TCTAAAATAT TAAATCATGT ATAGAAAATA GTCCAATTAA TCAAGATAGC 2365

GTTGAACGTG ACCTGATACT AGATTGCACA AACGAAATAA AACCAATCTG AAGTAAAAGC 2425

AATAGCACAA TAAAAGAGAA GATACCTCAT TTAAC 2460

ES 2 336 977 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2

(i) CARECTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 439 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

```

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

ES 2 336 977 T3

	305	310	315	320
5	Ala Cys Gly Trp	Phe Ala Phe Ile Phe	Pro Asn Val Gly Phe Val Asn	
		325	330	335
10	Cys Thr Ile Glu Ile Gly Lys Met Ile Asp Ser Lys Ala Phe Gln Met			
		340	345	350
15	Phe Gly His Ile Ile Gly Val Ile Leu Cys Ile Gln Trp Ile Leu Leu			
		355	360	365
20	Met Tyr Leu Met Val Arg Ala Phe Leu Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro			
		370	375	380
25	Gly Lys Asp Glu Asp Ala His Pro Pro Pro Lys Pro Asn Thr Gly Val			
		385	390	400
30	Leu Asn Pro Thr Phe Pro Pro Glu Lys Ala Pro Ala Ser Leu Glu Lys			
		405	410	415
35	Val Asp Thr His Val Thr Ser Thr Gly Gly Glu Ser Asp Pro Pro Ser			
		420	425	430
40	Ser Glu His Glu Ser Val			
		435		

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3

(i) CARECTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1927 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Lactococcus lactis*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: EML

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE:

(B) LOCALIZACIÓN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

30	TTATCATTTA ATAGTTATAA GCTAATTTTT ACTACCATTT CTTTGATTAA TATCATCTAT	60
35	TTTTATATAG AGACTTTTAA ATAAACATFG ACATTATTTA TGGGTTATAA ATAAAATTTA	120
40	TCAACACTAA GGAATTTGAC TATAACGATA AAAGAAGTTT ATAGTAATAA AGTAATAACA	180
45	TTAATTATAA TTTTATGGA GGTGTACGA TGGGTGCACA TGAAATTTTA AACAACTCCTT	240
50	TTTTAAATAA AGGAACAGCT TTTACT ATG AAA GAA CGT CAA GAA TTG GGG TTG	293
55	Met Lys Glu Arg Gln Glu Leu Gly Leu	
	1 5	
60	ATT GGT CTT CTT CCA CCA ACT GTT CAA ACA ATT GAG GAA CAA GCT GAA	341
65	Ile Gly Leu Leu Pro Pro Thr Val Gln Thr Ile Glu Glu Gln Ala Glu	
	10 15 20 25	
70	CAA ACT TAC GAA CAA TAT TTG ACA AAA CCA TCT GAT TTA GAA AAA CGT	389

ES 2 336 977 T3

	Gln	Thr	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Leu	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Leu	Glu	Lys	Arg	
					30					35					40		
5	CAT	TTC	TTG	ATG	GAA	ATT	TTT	AAT	ACA	AAC	CGT	ACT	TTG	TTT	TAC	TAC	437
	His	Phe	Leu	Met	Glu	Ile	Phe	Asn	Thr	Asn	Arg	Thr	Leu	Phe	Tyr	Tyr	
				45					50					55			
10	TTA	TTC	AAC	AAA	CAT	ATT	GTA	GAA	TTT	AAT	CCA	GTT	GTT	TAT	GAT	CCA	485
	Leu	Phe	Asn	Lys	His	Ile	Val	Glu	Phe	Asn	Pro	Val	Val	Tyr	Asp	Pro	
				60				65					70				
15	ACA	ATT	GCT	GAT	ACA	ATT	GAA	AAC	TAC	AGT	CAT	TTG	TTC	GTA	GAT	CCA	533
	Thr	Ile	Ala	Asp	Thr	Ile	Glu	Asn	Tyr	Ser	His	Leu	Phe	Val	Asp	Pro	
				75			80					85					
20	CAA	TAT	GCT	GCT	TAT	CTT	GAT	ATT	AAC	CAC	CCT	GAA	AAC	ATT	ACT	GAA	581
	Gln	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Leu	Asp	Ile	Asn	His	Pro	Glu	Asn	Ile	Thr	Glu	
				90			95				100					105	
25	ACA	TTG	AAA	AAT	GCA	GCA	GGT	GAC	AGA	GAA	ATT	CGT	CTT	ATT	GTT	GTA	629
	Thr	Leu	Lys	Asn	Ala	Ala	Gly	Asp	Arg	Glu	Ile	Arg	Leu	Ile	Val	Val	
				110						115					120		
30	ACT	GAT	GCT	GAA	GGA	ATC	CTT	GGT	ATT	GGA	GAC	TGG	GGA	ACT	CAA	GGT	677
	Thr	Asp	Ala	Glu	Gly	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Asp	Trp	Gly	Thr	Gln	Gly	
				125					130					135			
35	GTT	GAT	ATC	TCA	GTT	GGT	AAA	TTA	ATG	ATT	TAT	ACA	GCC	GCA	GCA	GGT	725
	Val	Asp	Ile	Ser	Val	Gly	Lys	Leu	Met	Ile	Tyr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	
				140				145					150				
40	ATT	GAT	CCA	GCG	TCT	GTA	CTT	CCA	GTT	GTT	ATT	GAT	GCA	GGA	ACA	AAT	773
	Ile	Asp	Pro	Ala	Ser	Val	Leu	Pro	Val	Val	Ile	Asp	Ala	Gly	Thr	Asn	
				155			160					165					
45	AGA	AAA	GAA	CTT	TTA	GAA	GAT	CAT	TTG	TAT	CTT	GGA	AAT	CAT	CAA	GAA	821
	Arg	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Asp	His	Leu	Tyr	Leu	Gly	Asn	His	Gln	Glu	
				170			175				180					185	
50	CGT	ATT	TAC	GGT	GAT	CAA	TAC	TAC	AGT	TTC	GTC	GAT	CAA	TTT	GTA	GAA	869
	Arg	Ile	Tyr	Gly	Asp	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Val	Asp	Gln	Phe	Val	Glu	
				190						195					200		
55	ACT	GCA	GAA	TCA	ATT	TTC	CCT	AAA	TTG	TAC	CTT	CAC	TGG	GAA	GAT	TTC	917
	Thr	Ala	Glu	Ser	Ile	Phe	Pro	Lys	Leu	Tyr	Leu	His	Trp	Glu	Asp	Phe	
				205					210					215			
60	GGA	CGT	TCA	AAT	GCT	GCA	ACA	ATT	TTA	AAT	AAC	TAC	AAA	ACA	AAA	ATC	965
	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Ala	Thr	Ile	Leu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Lys	Ile	
				220				225					230				
65	CCA	ACA	TTT	AAT	GAT	GAC	ATT	CAA	GGA	ACT	GGT	ATT	GTT	GTT	TTA	GGT	1013
	Pro	Thr	Phe	Asn	Asp	Asp	Ile	Gln	Gly	Thr	Gly	Ile	Val	Val	Leu	Gly	
				235			240					245					
70	GGT	ATT	TTC	GGA	TCA	CTT	GAC	ATT	ACA	GGT	GAA	AAA	TTA	ACT	GAT	CAA	1061
	Gly	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Asp	Ile	Thr	Gly	Glu	Lys	Leu	Thr	Asp	Gln	
				250			255				260				265		
75	GTA	TAT	CTT	TGC	TAT	GGT	GGT	GGT	TCA	GCC	GGT	GCA	GGG	ATT	GCT	GGT	1109
	Val	Tyr	Leu	Cys	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	
				270					275					280			
80	CGT	GTT	CAT	GCT	GAA	ATG	GTT	AGT	GAA	GGT	CTT	TCT	GAA	GAA	GAA	GCT	1157
	Arg	Val	His	Ala	Glu	Met	Val	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	
				285					290					295			

ES 2 336 977 T3

	TAC AAA CAT TTC TTC ATG ATT GAT CAA CAA GGT TTA CTT TTT GAT GAT	1205
	Tyr Lys His Phe Phe Met Ile Asp Gln Gln Gly Leu Leu Phe Asp Asp	
	300 305 310	
5	ATG GAA GAC CTT ACA CCA GCT CAA AAA CCA TTT GCT AAA AAA CGT GCT	1253
	Met Glu Asp Leu Thr Pro Ala Gln Lys Pro Phe Ala Lys Lys Arg Ala	
	315 320 325	
10	GAT TAT AAA GAT GCT GGA GAT ATG ACT GAC CTT CTT AAC GTT GTT AAG	1301
	Asp Tyr Lys Asp Ala Gly Asp Met Thr Asp Leu Leu Asn Val Val Lys	
	330 335 340 345	
15	ACA GTA AAA CCA ACT ATT TTA GTA GGA ACT TCA ACT AAT CCA GGT GCC	1349
	Thr Val Lys Pro Thr Ile Leu Val Gly Thr Ser Thr Asn Pro Gly Ala	
	350 355 360	
20	TTT ACA AAA GAA GTT GTT GAA GCA ATG TGT GCT AAT ACA GAA CGC CCA	1397
	Phe Thr Lys Glu Val Val Glu Ala Met Cys Ala Asn Thr Glu Arg Pro	
	365 370 375	
25	GTA ATC TTC CCT ATC TCA AAT CCA ACT AAA AAA ATG GAA ACT ACA GCT	1445
	Val Ile Phe Pro Ile Ser Asn Pro Thr Lys Lys Met Glu Thr Thr Ala	
	380 385 390	
30	GAA CAA GTT ATT GAG TGG TCT GAT GGA AAA GCT TTT GTC GCT ACT GGT	1493
	Glu Gln Val Ile Glu Trp Ser Asp Gly Lys Ala Phe Val Ala Thr Gly	
	395 400 405	
35	GTT CCT TCA GGA ACA ATC AGC TAC AAA GGT GTT GAT TAT CAA ATT GGT	1541
	Val Pro Ser Gly Thr Ile Ser Tyr Lys Gly Val Asp Tyr Gln Ile Gly	
	410 415 420 425	
40	CAA GCA AAT AAC TCA CTT ATC TAC CCA GGT TTG GGC TTA GGA ATG TTG	1589
	Gln Ala Asn Asn Ser Leu Ile Tyr Pro Gly Leu Gly Leu Gly Met Leu	
	430 435 440 440	
45	GCA TCT GAA GCA AAA CTT TTG ACA GAT GAA ATG ATC GGT GCA GCT GCA	1637
	Ala Ser Glu Ala Lys Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Gly Ala Ala Ala	
	445 450 455	
50	CAT TCA TTG AGC GGT TTA GTA GAT CCA GGT AAA CCA GGT GCT CCT GTT	1685
	His Ser Leu Ser Gly Leu Val Asp Pro Gly Lys Pro Gly Ala Pro Val	
	460 465 470	
55	CTT CCT CCA TTT GAA TTT GTT GCT GAT GTA TCA ATT AAA GTT GCA GAA	1733
	Leu Pro Pro Phe Glu Phe Val Ala Asp Val Ser Ile Lys Val Ala Glu	
	475 480 485	
60	GCA GTT GCT AAG AAA GCT CAA GAA CAA GGT CTT ACT GAA TCT AAA GAA	1781
	Ala Val Ala Lys Lys Ala Gln Glu Gln Gly Leu Thr Glu Ser Lys Glu	
	490 495 500 505	
65	ACT GAT ATG GCT AAA GCA GTT CGT GAT CTT AAA TGG TAT CCA GAG TAC	1829
	Thr Asp Met Ala Lys Ala Val Arg Asp Leu Lys Trp Tyr Pro Glu Tyr	
	510 515 520	
70	TAA GGGGAATATC TTAAATGAAA AAACCTAAAG AAACGAAAAT ATCGGGAATT	1882
	*	
75	AGTCTTCCT TATATGCCTT TTCGTAGCT GTCATCATAG TTGTA	1927

ES 2 336 977 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4

(i) CARECTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 522 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

```

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

ES 2 336 977 T3

	305				310					315				320		
5	Gln	Lys	Pro	Phe	Ala 325	Lys	Lys	Arg	Ala	Asp 330	Tyr	Lys	Asp	Ala	Gly 335	Asp
	Met	Thr	Asp	Leu 340	Leu	Asn	Val	Val	Lys	Thr	Val	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu
10	Val	Gly	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Gly 360	Ala	Phe	Thr	Lys	Glu 365	Val	Val	Glu
	Ala	Met	Cys	Ala	Asn	Thr	Glu	Arg	Pro	Val	Ile	Phe	Pro	Ile	Ser	Asn
15	Pro	Thr	Lys	Lys	Met	Glu 390	Thr	Thr	Ala	Glu	Gln 395	Val	Ile	Glu	Trp	Ser 400
	Asp	Gly	Lys	Ala	Phe 405	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Gly	Thr	Ile	Ser 415
20	Tyr	Lys	Gly	Val 420	Asp	Tyr	Gln	Ile	Gly 425	Gln	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ile 430
	Tyr	Pro	Gly 435	Leu	Gly	Leu	Gly	Met 440	Leu	Ala	Ser	Glu	Ala	Lys	Leu	Leu
25	Thr	Asp	Glu	Met	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	His	Ser	Leu	Ser	Gly	Leu	Val 460
	Asp	Pro	Gly	Lys	Pro	Gly 470	Ala	Pro	Val	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Phe	Val 480
30	Ala	Asp	Val	Ser	Ile 485	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Lys	Ala	Gln 495
	Glu	Gln	Gly	Leu 500	Thr	Glu	Ser	Lys	Glu 505	Thr	Asp	Met	Ala	Lys	Ala	Val 510
35	Arg	Asp	Leu	Lys	Trp	Tyr	Pro	Glu	Tyr	*						
40			515					520								

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5

(i) CARECTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 2686 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 55 (A) ORGANISMO: *Lactococcus lactis*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: *mleS*

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 60 (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

65

ES 2 336 977 T3

CTTTTGTGTA AAAAATTTCT AATCAAATTA TTAACCTAAA AGATACATAA ATTTAAAAAA 60
TAAAAGTAGA GTGATTTTAC TCTACTTTTT TAGAATACTT TTATATAATA GGAATATGA 120
ATAAAGCAAA GCGCACAAAT TTGGTTTTAT TTAATAAAAT GGATACTTTA GATACACAAC 180
5 CACCATTGAC AAAAATCTT AATCTTAAAT TGTTTGAAAC CCTGATAAAT TAGGAATAGT 240
AATAGGAGAA GAACAGTTTA TCATTTAATA GTTATAAGCT AATTTTACT ACCATTTCTT 300
10 TGATTAATAT CATCTATTTT TATATAGAGA CTTTAAATA AACATTGACA TTATTTATGC 360
GTTATAAATA AAATTTATCA ACACTAAGGA ATTTGACTAT AACGATAAAA GAAGTTTATA 420
GTAATAAAGT AATAACATTA ATTATAATTT TTATGGAGGT TGTACG ATG CGT GCA 475
Met Arg Ala
15 1
CAT GAA ATT TTA AAC AAT CCT TTT TTA AAT AAA GGA ACA GCT TTT ACT 523
His Glu Ile Leu Asn Asn Pro Phe Leu Asn Lys Gly Thr Ala Phe Thr
5 10 15
20 ATG AAA GAA CGT CAA GAA TTG GGG TTG ATT GGT CTT CTT CCA CCA ACT 571
Met Lys Glu Arg Gln Glu Leu Gly Leu Ile Gly Leu Leu Pro Pro Thr
20 25 30 35
25 GTT CAA ACA ATT GAG GAA CAA GCT GTA CAA ACT TAC GAA CAA TAT TTG 619
Val Gln Thr Ile Glu Glu Gln Ala Val Gln Thr Tyr Glu Gln Tyr Leu
40 45 50
30 ACA AAA CCA TCT GAT TTA GAA AAA CGT CAT TTC TTG ATG GAA ATT TTT 667
Thr Lys Pro Ser Asp Leu Glu Lys Arg His Phe Leu Met Glu Ile Phe
55 60 65
35 AAT ACA AAC CGT ACT TTG TTT TAC TAC TTA TTC AAC AAA CAT ATT GTA 715
Asn Thr Asn Arg Thr Leu Phe Tyr Tyr Leu Phe Asn Lys His Ile Val
70 75 80
40 GAA TTT AAT CCA GTT GTT TAT GAT CCA ACA ATT GCT GAT ACA ATT GAA 763
Glu Phe Asn Pro Val Val Tyr Asp Pro Thr Ile Ala Asp Thr Ile Glu
85 90 95
45 AAC TAC AGT CAT TTG TTC GTA GAT CCA CAA TAT GCT GCT TAT CTT GAT 811
Asn Tyr Ser His Leu Phe Val Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Tyr Leu Asp
100 105 110 115
50 ATT AAC CAC CCT GAA AAC ATT ACT GAA ACA TTG AAA AGT GCA GCA GGT 859
Ile Asn His Pro Glu Asn Ile Thr Glu Thr Leu Lys Ser Ala Ala Gly
120 125 130
55 GAC AGA GAA ATT CGT CTT ATT GTT GTA ACT GAT GCT GAA GGA ATC CTT 907
Asp Arg Glu Ile Arg Leu Ile Val Val Thr Asp Ala Glu Gly Ile Leu
135 140 145
60 GGT ATT GGA GAC TGG GGA ACT CAA GGT GTT GAT ATC TCA GTT GGT AAA 955
Gly Ile Gly Asp Trp Gly Thr Gln Gly Val Asp Ile Ser Val Gly Lys
150 155 160
65 TTA ATG ATT TAT ACA GCC GCA GCA GGT ATT GAT CCA GCG TCT GTA CTT 1003
Leu Met Ile Tyr Thr Ala Ala Ala Gly Ile Asp Pro Ala Ser Val Leu
165 170 175
70 CCA GTT GTT ATT GAT GCA GGA ACA AAT AGA AAA GAA CTT TTA GAA GAT 1051
Pro Val Val Ile Asp Ala Gly Thr Asn Arg Lys Glu Leu Leu Glu Asp
180 185 190 195
75 CAT TTG TAT CTT GGA AAT CAT CAA GAA CGT ATT TAC GGT GAT CAA TAC 1099
His Leu Tyr Leu Gly Asn His Gln Glu Arg Ile Tyr Gly Asp Gln Tyr

ES 2 336 977 T3

	200					205					210						
5	TAC Tyr	AGT Ser	TTC Phe	GTC Val 215	GAT Asp	CAA Gln	TTT Phe	GTA Val 220	GAA Glu	ACT Thr	GCA Ala	GAA Glu	TCA Ser	ATT Ile 225	TTC Phe	CCT Pro	1147
	AAA Lys	TTG Leu	TAC Tyr 230	CTT Leu	CAC His	TGG Trp	GAA Glu	GAT Asp 235	TTC Phe	GGA Gly	CGT Arg	TCA Ser	AAT Asn 240	GCT Ala	GCA Ala	ACA Thr	1195
10	ATT Ile	TTA Leu 245	AAT Asn	AAC Asn	TAC Tyr	AAA Lys	ACA Thr 250	AAA Lys	ATC Ile	CCA Pro	ACA Thr 255	TTT Phe	AAT Asn	GAT Asp	GAC Asp	ATT Ile	1243
15	CAA Gln 260	GGA Gly	ACT Thr	GGT Gly	ATT Ile	GTT Val 265	GTT Val	TTA Leu	GGT Gly	GGT Gly	ATT Ile 270	TTC Phe	GGA Gly	TCA Ser	CTT Leu	GAC Asp 275	1291
	ATT Ile	ACA Thr	GGT Gly	GAA Glu 280	AAA Lys	TTA Leu	ACT Thr	GAT Asp	CAA Gln 285	GTA Val	TAT Tyr	CTT Leu	TGC Cys	TAT Tyr	GGT Gly 290	GGT Gly	1339
20	GGT Gly	TCA Ser	GCC Ala	GGT Gly 295	GCA Ala	GGG Gly	ATT Ile	GCT Ala	GGT Gly 300	CGT Arg	GTT Val	CAT His	GCT Ala	GAA Glu 305	ATG Met	GTT Val	1387
25	AGT Ser	GAA Glu 310	GGT Leu	CTT Ser	TCT Glu	GAA Glu	GAA Glu 315	GCT Ala	TAC Tyr	AAA Lys	CAT His	TTC Phe 320	TTC Phe	ATG Met	ATT Ile	1435	
	GAT Asp 325	CAA Gln	CAA Gly	GGT Leu	TTA Leu	CTT Leu	TTT Phe 330	GAT Asp	GAT Asp	ATG Met	GAA Glu	GAC Asp 335	CTT Leu	ACA Thr	CCA Pro	GCT Ala	1483
30	CAA Gln 340	AAA Lys	CCA Pro	TTT Phe	GCT Ala	AAA Lys 345	AAA Lys	CGT Arg	GCT Ala	GAT Asp	TAT Tyr 350	AAA Lys	GAT Asp	GCT Ala	GGA Gly	GAT Asp 355	1531
35	ATG Met	ACT Thr	GAC Asp	CTT Leu 360	CTT Leu	AAC Asn	GTT Val	GTT Val	AAG Lys	ACA Thr 365	GTA Val	AAA Lys	CCA Pro	ACT Thr	ATT Ile 370	TTA Leu	1579
	GTA Val	GGA Gly	ACT Thr 375	TCA Ser	ACT Thr	AAT Asn	CCA Pro	GGT Gly	GCC Ala 380	TTT Phe	ACA Thr	AAA Lys	GAA Glu	GTT Val 385	GTT Val	GAA Glu	1627
40	GCA Ala	ATG Met	TGT Cys 390	GCT Ala	AAT Asn	ACA Thr	GAA Glu	CGC Arg 395	CCA Pro	GTA Val	ATC Ile	TTC Phe	CCT Pro 400	ATC Ile	TCA Ser	AAT Asn	1675
45	CCA Pro	ACT Thr 405	AAA Lys	AAA Lys	ATG Met	GAA Glu	ACT Thr 410	ACA Thr	GCT Ala	GAA Glu	CAA Gln 415	GTT Val	ATT Ile	GAG Glu	TGG Trp	TCT Ser	1723
	GAT Asp 420	GGA Gly	AAA Lys	GCT Ala	TTT Phe	GTC Val 425	GCT Ala	ACT Thr	GGT Gly	GTT Val	CCT Pro 430	TCA Ser	GGA Gly	ACA Thr	ATC Ile	AGC Ser 435	1771
50	TAC Tyr	AAA Lys	GGT Gly	GTT Val 440	GAT Asp	TAT Tyr	CAA Gln	ATT Ile	GGT Gly	CAA Gln 445	GCA Ala	AAT Asn	AAC Asn	TCA Ser	CTT Leu 450	ATC Ile	1819
55	CAC His	CCA Pro	GGT Gly 455	TTG Leu	GGC Gly	TTA Leu	GGA Gly	ATG Met	TTG Leu 460	GCA Ala	TCT Ser	GAA Glu	GCA Ala	AAA Lys 465	CTT Leu	TTG Leu	1867

ES 2 336 977 T3

ACA GAT GAA ATG ATC GGT GCA GCT GCA CAT TCA TTG AGC GGT TTA GTA 1915
 Thr Asp Glu Met Ile Gly Ala Ala Ala His Ser Leu Ser Gly Leu Val
 470 475 480
 5 GAT CCA GGT AAA CCA GGT GCT CCT GTT CTT CCT CCA TTT GAA TTT GTT 1963
 Asp Pro Gly Lys Pro Gly Ala Pro Val Leu Pro Pro Phe Glu Phe Val
 485 490 495
 10 GCT GAT GTA TCA ATT AAA GTT GCA GAA GCA GTT GCT AAG AAA GCT CAA 2011
 Ala Asp Val Ser Ile Lys Val Ala Glu Ala Val Ala Lys Lys Ala Gln
 500 505 510 515
 GAA CAA GGT CTT ACT GAA TCT AAA GAA ACT GAT ATG GCT AAA GCA GTT 2059
 Glu Gln Gly Leu Thr Glu Ser Lys Glu Thr Asp Met Ala Lys Ala Val
 520 525 530
 15 CGT GAT CTT AAA TGG TAT CCA GAG TAC TAA GGGGAATATC TAAATGAAA 2109
 Arg Asp Leu Lys Trp Tyr Pro Glu Tyr *
 535 540
 20 AAACCTAAAG AAACGAAAT ATCGGGAATT AGTCTCCCT TATATGCCTT TTTCGTAGCT 2169
 GTCATCATAG TTGTAACACT ATTAGGAAAA CTTCCACTTG ATATGGTAGG GTTAACTCTC 2229
 CTACTTGTA CATTAGGCCA CCTATTATAC TTCATAGGAG AAAAATCCCT TATTATGAAT 2289
 25 TCATACTTAG GTGGGGGATC TGTTTTCACT TTAATTGGTG CTA CTCTATT ATCTTTCTTC 2349
 CACATTGTTC CTTCAAATGT TATTGGAGCA GTTCCAATT TTATGGGTGG AAAATTTGGA 2409
 TTTCCTGATP TTTATATAGC TGCACCTATC TGTGGATCTA TTTTAGGAAT GAACAGAAAT 2469
 30 CTTTGGTTA AAGCTTCCAA GAAATTTATT CCGATTGCTT TAATCACTAT GGTATTGGT 2529
 TTCTTCTCAG TAGGTCTTGT AGGAATGCTT ATTGGTAATG GATTTGCTGA TTCTGTAATG 2589
 TATGTTTCTA TGCCAATGAT GTCAGGTGGT ATGGGAGCCG GAATTACTCC ACTCTCTCAA 2649
 35 ATCTATGCAG CCGGATTGGC TCATGGAAAC CAAGCAG 2686

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6

(i) CARECTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 541 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

Met Arg Ala His Glu Ile Leu Asn Asn Pro Phe Leu Asn Lys Gly Thr
 1 5 10 15
 55 Ala Phe Thr Met Lys Glu Arg Gln Glu Leu Gly Leu Ile Gly Leu Leu
 20 25 30
 Pro Pro Thr Val Gln Thr Ile Glu Glu Gln Ala Val Gln Thr Tyr Glu
 35 40 45
 60 Gln Tyr Leu Thr Lys Pro Ser Asp Leu Glu Lys Arg His Phe Leu Met
 50 55 60
 Glu Ile Phe Asn Thr Asn Arg Thr Leu Phe Tyr Tyr Leu Phe Asn Lys
 65 70 75 80

ES 2 336 977 T3

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

65

ES 2 336 977 T3

Thr Ile Ser Tyr Lys Gly Val Asp Tyr Gln Ile Gly Gln Ala Asn Asn
 435 440 445
 5 Ser Leu Ile His Pro Gly Leu Gly Leu Gly Met Leu Ala Ser Glu Ala
 450 455 460
 Lys Leu Leu Thr Asp Glu Met Ile Gly Ala Ala Ala His Ser Leu Ser
 465 470 475 480
 10 Gly Leu Val Asp Pro Gly Lys Pro Gly Ala Pro Val Leu Pro Pro Phe
 485 490 495
 Glu Phe Val Ala Asp Val Ser Ile Lys Val Ala Glu Ala Val Ala Lys
 500 505 510
 15 Lys Ala Gln Glu Gln Gly Leu Thr Glu Ser Lys Glu Thr Asp Met Ala
 515 520 525
 Lys Ala Val Arg Asp Leu Lys Trp Tyr Pro Glu Tyr *
 530 535 540

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7

- (i) CARECTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (E) LONGITUD: 2422 pares de bases
- (A) TIPO: ácido nucleico
- (B) TIPO DE CADENA: sencilla
- (C) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Schizosaccharomyces pombe*
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (B) CLON: *mae2*
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE:
- (B) LOCALIZACIÓN:
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

ATG CCT GCA GGA ACC AAA GAA CAA ATC GAG TGT CCT TTA AAA GGA GTA	48
Met Pro Ala Gly Thr Lys Glu Gln Ile Glu Cys Pro Leu Lys Gly Val	
1 5 10 15	
ACT TTG TTA AAC TCT CCT CGC TAC AAT AAG GAC ACT GCT TTT ACA CCT	96
Thr Leu Leu Asn Ser Pro Arg Tyr Asn Lys Asp Thr Ala Phe Thr Pro	
20 25 30	
GAG GAG CGT CAA AAA TTT GAG ATT TCA TCA CGT CTT CCC CCC ATT GTT	144
Glu Glu Arg Gln Lys Phe Glu Ile Ser Ser Arg Leu Pro Pro Ile Val	
35 40 45	
GAA ACT TTG CAA CAA CAA GTG GAT CGC TGT TAT GAC CAG TAC AAA GCA	192
Glu Thr Leu Gln Gln Gln Val Asp Arg Cys Tyr Asp Gln Tyr Lys Ala	
50 55 60	
ATC GGT GAT GAG CCC TTA CAG AAG AAT TTG TAT CTT TCT CAA TTA AGC	240
Ile Gly Asp Glu Pro Leu Gln Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Gln Leu Ser	
65 70 75 80	
GTC ACC AAC CAA ACT CTG TTT TAC GCA CTC ATC AGC CAA CAT TTG ATC	288
Val Thr Asn Gln Thr Leu Phe Tyr Ala Leu Ile Ser Gln His Leu Ile	

ES 2 336 977 T3

	85					90					95						
5	GAA	ATG	ATT	CCT	ATC	ATC	TAT	ACA	CCT	ACC	GAA	GGC	GAT	GCC	ATC	AAG	336
	Glu	Met	Ile	Pro	Ile	Ile	Tyr	Thr	Pro	Thr	Glu	Gly	Asp	Ala	Ile	Lys	
				100					105					110			
	CAG	TTT	TCC	GAT	ATA	TAT	CGT	TAT	CCT	GAG	GGT	TGT	TAT	TTG	GAT	ATT	384
	Gln	Phe	Ser	Asp	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Glu	Gly	Cys	Tyr	Leu	Asp	Ile	
			115				120						125				
10	GAT	CAT	AAC	GAT	TTG	TCT	TAT	ATC	AAG	CAA	CAG	CTT	TCC	GAG	TTT	GGA	432
	Asp	His	Asn	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ile	Lys	Gln	Gln	Leu	Ser	Glu	Phe	Gly	
		130					135					140					
15	AAA	TCC	GAT	AGT	GTC	GAA	TAC	ATT	ATC	ATT	ACC	GAT	TCT	GAA	GGT	ATT	480
	Lys	Ser	Asp	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Ile	Ile	Thr	Asp	Ser	Glu	Gly	Ile	
	145				150						155					160	
20	TTG	GGT	ATC	GGC	GAT	CAA	GGT	GTT	GGT	GGT	GTC	TTA	ATT	TCA	GTT	GCC	528
	Leu	Gly	Ile	Gly	Asp	Gln	Gly	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Ser	Val	Ala	
				165					170						175		
25	AAG	GGA	CAT	TTA	ATG	ACT	TTA	TGC	GCG	GGT	TTA	GAC	CCT	AAT	CGA	TTC	576
	Lys	Gly	His	Leu	Met	Thr	Leu	Cys	Ala	Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Arg	Phe	
				180					185					190			
30	TTG	CCC	ATT	GTT	CTC	GAT	GTT	GGC	ACC	AAC	AAT	GAA	ACC	CAT	CGT	AAA	624
	Leu	Pro	Ile	Val	Leu	Asp	Val	Gly	Thr	Asn	Asn	Glu	Thr	His	Arg	Lys	
			195					200					205				
35	AAT	CAT	CAA	TAC	ATG	GGT	TTG	AGA	AAG	GAT	CGT	GTT	CGT	GGT	GAA	CAG	672
	Asn	His	Gln	Tyr	Met	Gly	Leu	Arg	Lys	Asp	Arg	Val	Arg	Gly	Glu	Gln	
			210				215					220					
40	TAT	GAC	AGC	TTT	TTG	GAC	AAT	GTT	ATA	AAG	GCC	ATT	CGT	GAA	GTC	TTT	720
	Tyr	Asp	Ser	Phe	Leu	Asp	Asn	Val	Ile	Lys	Ala	Ile	Arg	Glu	Val	Phe	
	225				230						235				240		
45	CCT	GAG	GCC	TTT	ATT	CAT	TTT	GAG	GAT	TTT	GGT	CTT	GCC	AAC	GCC	AAG	768
	Pro	Glu	Ala	Phe	Ile	His	Phe	Glu	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Asn	Ala	Lys	
				245						250					255		
50	CGC	ATT	TTA	GAC	CAC	TAT	CGT	CCT	GAC	ATT	GCC	TGC	TTT	AAC	GAT	GAT	816
	Arg	Ile	Leu	Asp	His	Tyr	Arg	Pro	Asp	Ile	Ala	Cys	Phe	Asn	Asp	Asp	
			260					265						270			
55	ATC	CAG	GGA	ACC	GGT	GCC	GTA	GCA	TTG	GCC	GCC	ATT	ATT	GGC	GCC	CTT	864
	Ile	Gln	Gly	Thr	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Ile	Gly	Ala	Leu	
			275				280						285				
60	CAC	GTT	ACG	AAA	TCT	CCC	TTA	ACC	GAG	CAG	CGC	ATC	ATG	ATC	TTT	GGT	912
	His	Val	Thr	Lys	Ser	Pro	Leu	Thr	Glu	Gln	Arg	Ile	Met	Ile	Phe	Gly	
		290					295					300					
65	GCA	GGT	ACT	GCT	GGT	GTT	GGT	ATC	GCC	AAC	CAA	ATT	GTT	GCC	GGT	ATG	960
	Ala	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Gly	Ile	Ala	Asn	Gln	Ile	Val	Ala	Gly	Met	
	305				310						315				320		
70	GTG	ACA	GAT	GGC	CTT	TCA	TTA	GAT	AAG	GCT	AGA	GGT	AAT	CTT	TTC	ATG	1008
	Val	Thr	Asp	Gly	Leu	Ser	Leu	Asp	Lys	Ala	Arg	Gly	Asn	Leu	Phe	Met	
				325					330					335			
75	ATT	GAT	CGT	TGC	GGT	TTG	CTT	TTG	GAG	AGA	CAT	GCT	AAG	ATT	GCT	ACT	1056
	Ile	Asp	Arg	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Glu	Arg	His	Ala	Lys	Ile	Ala	Thr	
			340						345					350			

ES 2 336 977 T3

	GAT GGA CAA AAG CCA TTT TTG AAG AAG GAC TCT GAC TTT AAG GAA GTC	1104
	Asp Gly Gln Lys Pro Phe Leu Lys Lys Asp Ser Asp Phe Lys Glu Val	
	355 360 365	
5	CCT TCT GGA GAC ATT AAT TTA GAG AGT GCT ATT GCA CTC GTC AAG CCC	1152
	Pro Ser Gly Asp Ile Asn Leu Glu Ser Ala Ile Ala Leu Val Lys Pro	
	370 375 380	
10	ACC ATT CTT TTG GGA TGT TCC GGT CAA CCG GGT AAA TTT ACA GAG AAA	1200
	Thr Ile Leu Leu Gly Cys Ser Gly Gln Pro Gly Lys Phe Thr Glu Lys	
	385 390 395 400	
	GCC ATT CGT GAA ATG AGC AAG CAC GTC GAG CGC CCC ATC ATT TTC CCA	1248
	Ala Ile Arg Glu Met Ser Lys His Val Glu Arg Pro Ile Ile Phe Pro	
	405 410 415	
15	ATC TCT AAT CCC ACT ACT CTT ATG GAA GCG AAG CCC GAT CAA ATT GAC	1296
	Ile Ser Asn Pro Thr Thr Leu Met Glu Ala Lys Pro Asp Gln Ile Asp	
	420 425 430	
20	AAA TGG TCA GAT GGA AAG GCT TTG ATA GCC ACT GGT TCC CCA CTT CCT	1344
	Lys Trp Ser Asp Gly Lys Ala Leu Ile Ala Thr Gly Ser Pro Leu Pro	
	435 440 445	
25	CCT CTC AAT CGC AAT GGT AAA AAA TAC GTG ATT TCC CAA TGC AAC AAT	1392
	Pro Leu Asn Arg Asn Gly Lys Lys Tyr Val Ile Ser Gln Cys Asn Asn	
	450 455 460	
	GCC CTC CTT TAC CCT GCT CTT GGT GTT GCA TGT GTG TTA TCC CGT TGC	1440
	Ala Leu Leu Tyr Pro Ala Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ser Arg Cys	
	465 470 475 480	
30	AAG TTA TTG AGT GAT GGT ATG CTG AAA GCA GCT TCC GAT GCT TTG GCC	1488
	Lys Leu Leu Ser Asp Gly Met Leu Lys Ala Ala Ser Asp Ala Leu Ala	
	485 490 495	
35	ACT GTT CCC AGA TCT TTA TTT GCT GCT GAT GAA GCC CTC TTG CCA GAT	1536
	Thr Val Pro Arg Ser Leu Phe Ala Ala Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp	
	500 505 510	
	TTG AAC AAT GCT CGC GAA ATT TCT CGT CAC ATT GTT TTT GCA GTC TTG	1584
	Leu Asn Asn Ala Arg Glu Ile Ser Arg His Ile Val Phe Ala Val Leu	
	515 520 525	
40	AAG CAA GCT GTT TCT GAG GGA ATG AGC ACT GTG GAT TTA CCC AAA GAT	1632
	Lys Gln Ala Val Ser Glu Gly Met Ser Thr Val Asp Leu Pro Lys Asp	
	530 535 540	
45	GAT GCT AAA TTG AAG GAA TGG ATT ATT GAA CGT GAA TGG AAT CCC GAA	1680
	Asp Ala Lys Leu Lys Glu Trp Ile Ile Glu Arg Glu Trp Asn Pro Glu	
	545 550 555 560	
	TAC AAG CCT TTT GTA TAA AGCCTTTTAT TTTATTTTTT TTTGAAACCT	1728
	Tyr Lys Pro Phe Val *	
	565	
50	GCTTTTGGT CTGCTTGTAT TTAAAGATAT TCATGTAAAT AATTTTTTGA AAGATGAATT	1788
	TACAATAAGT TGCTAAAAAG AAAATTCCCG TTTTATTCAA ATGCTCATAT TTGAATATTA	1848
	GAAACATTAT GTACATATTT AGGCATCTTC CATTAGAAT GATTAATGCG TAGAAAGATA	1908
55	ATCAATTATTT ATTGCTTTTT TCTCCTATTG TTATTTCATCA ACTATATACA TTAAAAAGAT	1968
	TGGAGTATAG CAGAGGTAGA ATTTCTTTAC TCTGAAAAGT AAATCGAAAT AAATGGTATA	2028
60		
65		

ES 2 336 977 T3

TGATTCAGTC TGAATAAAT TGAGCACGAG TATTCAAACC GTAAACCGTT ATGTATTGAA 2088
 TGAACCATTT GATTTAATAA AGGTTATAAT TTTACGAATT TATAATGGGT AGTTATATAG 2148
 5 AAACACCAAG TTAACCTTAT AATCAGATTA ATCTGAATAA TAAATTAATA AGGGAAAGAG 2208
 AAATCTGTAT ATGGATGAAA CAAACAAATA GTAAATCGCA TTTGACACCT ACAAATGTG 2268
 TGTGAATATA TACATACAAG GAGGGCCTGT AAATAGAACT TTGTATTCCC AAGGGATTTA 2328
 10 GTGAACACCC TTAAATCGT TATTACTAAA TTTCGTAGAT CAGTTTCTTG AAGGTAAACT 2388
 CATCACCCCC AAGTCTGGCT ATGCAGAAAT CCCC 2422

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(D) LONGITUD: 566 aminoácidos

(A) TIPO: aminoácidos

(B) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

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

ES 2 336 977 T3

Tyr Asp Ser Phe Leu Asp Asn Val Ile Lys Ala Ile Arg Glu Val Phe
 225 230 235 240
 5 Pro Glu Ala Phe Ile His Phe Glu Asp Phe Gly Leu Ala Asn Ala Lys
 245 250 255
 Arg Ile Leu Asp His Tyr Arg Pro Asp Ile Ala Cys Phe Asn Asp Asp
 260 265 270
 10 Ile Gln Gly Thr Gly Ala Val Ala Leu Ala Ala Ile Ile Gly Ala Leu
 275 280 285
 His Val Thr Lys Ser Pro Leu Thr Glu Gln Arg Ile Met Ile Phe Gly
 290 295 300
 15 Ala Gly Thr Ala Gly Val Gly Ile Ala Asn Gln Ile Val Ala Gly Met
 305 310 315 320
 Val Thr Asp Gly Leu Ser Leu Asp Lys Ala Arg Gly Asn Leu Phe Met
 325 330 335
 20 Ile Asp Arg Cys Gly Leu Leu Leu Glu Arg His Ala Lys Ile Ala Thr
 340 345 350
 Asp Gly Gln Lys Pro Phe Leu Lys Lys Asp Ser Asp Phe Lys Glu Val
 355 360 365
 25 Pro Ser Gly Asp Ile Asn Leu Glu Ser Ala Ile Ala Leu Val Lys Pro
 370 375 380
 Thr Ile Leu Leu Gly Cys Ser Gly Gln Pro Gly Lys Phe Thr Glu Lys
 385 390 395 400
 30 Ala Ile Arg Glu Met Ser Lys His Val Glu Arg Pro Ile Ile Phe Pro
 405 410 415
 35 Ile Ser Asn Pro Thr Thr Leu Met Glu Ala Lys Pro Asp Gln Ile Asp
 420 425 430
 Lys Trp Ser Asp Gly Lys Ala Leu Ile Ala Thr Gly Ser Pro Leu Pro
 435 440 445
 40 Pro Leu Asn Arg Asn Gly Lys Lys Tyr Val Ile Ser Gln Cys Asn Asn
 450 455 460
 Ala Leu Leu Tyr Pro Ala Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ser Arg Cys
 465 470 475 480
 45 Lys Leu Leu Ser Asp Gly Met Leu Lys Ala Ala Ser Asp Ala Leu Ala
 485 490 495
 Thr Val Pro Arg Ser Leu Phe Ala Ala Asp Glu Ala Leu Leu Pro Asp
 500 505 510
 50 Leu Asn Asn Ala Arg Glu Ile Ser Arg His Ile Val Phe Ala Val Leu
 515 520 525
 55 Lys Gln Ala Val Ser Glu Gly Met Ser Thr Val Asp Leu Pro Lys Asp
 530 535 540
 Asp Ala Lys Leu Lys Glu Trp Ile Ile Glu Arg Glu Trp Asn Pro Glu
 545 550 555 560
 60 Tyr Lys Pro Phe Val *
 565

65