

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 083**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2009 E 09749646 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2285954**

54 Título: **Uso de enzimas pectinolíticas para el tratamiento de pulpa de frutas y hortalizas y secuencias enzimáticas para las mismas**

30 Prioridad:

23.05.2008 DE 102008024778

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

17.03.2016

73 Titular/es:

**AB ENZYMES GMBH (100.0%)
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**PURANEN, TERHI;
SEIBOTH, BERNHARD;
MILOS, KLAUDIJA;
THEISS, WILFRIED;
KALLIO, JARNO;
KUBICEK, CHRISTIAN P. y
VEHMAANPERÄ, JARI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 564 083 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

Uso de enzimas pectinolíticas para el tratamiento de pulpa de frutas y hortalizas y secuencias enzimáticas para las mismas

5 La presente invención se refiere al uso de enzimas pectinolíticas o polipéptidos que tienen actividad pectinolítica para el tratamiento de pulpa de frutas u hortalizas. La invención se refiere además al uso de enzimas pectinolíticas para la preparación de zumo de frutas u hortalizas. Al menos una de las enzimas se puede obtener a partir de *Trichoderma reesei*. Por otra parte, la invención se refiere a secuencias polipeptídicas que tienen actividad pectinolítica adecuadas en el tratamiento de pulpa de frutas u hortalizas así como a polinucleótidos que codifican dichas secuencias polipeptídicas. Específicamente, la invención se refiere al uso de una poligalacturonasa procedente de *Trichoderma reesei* en el tratamiento de pulpa de frutas u hortalizas, particularmente pulpa de manzana, así como al uso de dicha enzima para la preparación de zumo de frutas u hortalizas, en particular zumo de manzana.

15 Los polímeros pectínicos son importantes constituyentes de las paredes de las células vegetales. La pectina es el principal polisacárido estructural de las laminillas y las paredes celulares de frutas y hortalizas. La textura de la fruta o la hortaliza depende de la cantidad y las propiedades de la pectina. Generalmente, la fruta inmadura contiene protopectina insoluble, mientras que la fruta madura contiene pectina más soluble. La pectina es un heteropolisacárido con una cadena principal compuesta por homogalacturonanos (regiones lisas) y ramnogalacturonanos (regiones pilosas) alternos. Las regiones lisas son polímeros lineales de ácido α -D-galacturónico con enlaces 1,4. Los residuos de ácido galacturónico se pueden metilesterificar en el grupo carboxilo.

20 Una fruta contiene enzimas pectinolíticas, que participan en el proceso de maceración natural durante y después de la maduración. Se usan pectinasas industriales para procesar frutas y hortalizas en piensos y alimentos. En procedimientos industriales se usan enzimas, p. ej. en el procesamiento de frutas u hortalizas, a fin de hidrolizar la pectina e incrementar el zumo cuando se prensa fruta o hortaliza, disminuir la viscosidad para poder concentrar zumos turbios o degradar la pectina completamente a fin de clarificar zumos y concentrarlos.

25 Los zumos de frutas y hortalizas, especialmente el zumo elaborado a partir de manzanas, se pueden producir bien mediante una operación de prensado o bien mediante procedimientos de licuefacción. Ambos procedimientos están apoyados por el uso de enzimas pectinolíticas. Básicamente, las frutas enteras se muelen y se tratan con enzimas pectinolíticas antes de prensarlas para liberar las paredes celulares y para promover el corrimiento libre del zumo. Después del prensado, habitualmente el zumo se calienta, lo que desactiva todas las enzimas de los zumos. 30 Posteriormente, el zumo se transfiere a depósitos de clarificación en los que se añade enzima adicional al zumo para despectinizar e hidrolizar el almidón antes de la filtración. A continuación, las enzimas se desactivan durante la última pasteurización del zumo o en el evaporador durante la concentración. Por ejemplo, en la producción de zumo de manzana, se requiere una cierta estructura de la pulpa para un buen resultado del prensado. Las pectinasas que provocan la degradación o maceración de las llamadas pectinas insolubles son desfavorables, ya que incrementan los sólidos del zumo. Si la estructura se destruye completamente, se alcanza el llamado efecto de salsa de manzana y el zumo es muy turbio después del prensado. Las pectinasas actúan preliminarmente sobre pectinas solubles y, así, dan como resultado una viscosidad inferior del ensayo del zumo y un corrimiento muy fácil. En la preparación de purés, se prefieren propiedades macerativas.

40 En la técnica anterior ya se han preparado pulpas de fruta/zumo de fruta usando enzimas pectinolíticas, que contienen pectinasas de la región lisa y pilosa. Pectinasas de la "región lisa" comprenden pectina estererasas (o pectina metilesterasas), poligalacturonasas y pectina liasas (o pectina transeliminadas). Pectinasas de la "región pilosa" comprenden principalmente endoarabanasas, arabinofuranosidasas, ramnogalacturonasas, arabinogalactanasas, entre otras. Ambas categorías de enzimas están presente en preparaciones de pectinasa estándar derivadas de *Aspergillus niger*. En el procedimiento de la técnica anterior, la pectinasa se añade durante la trituración de las manzanas a fin de conseguir una distribución adecuada de la enzima en la pulpa ya que la agitación no está recomendada. Después de un tiempo de espera de 30 - 120 minutos, la pulpa se prensa mediante sistemas de prensa horizontal o de correa. El zumo obtenido se tamiza a fin de separar partículas gruesas.

45 Posteriormente, el zumo se pasteuriza o se separa por arrastre de la esencia en un evaporador de vacío. Después de reenfriar hasta aproximadamente 48 - 52°C, el tratamiento del zumo tiene lugar a fin de despectinizar y degradar el almidón. Este tratamiento lleva aproximadamente 1 - 2 h seguido por un procedimiento de filtración, es decir ultrafiltración.

55 Las preparaciones de pectinasa (composiciones de pectinasa) de la técnica anterior que consisten en pectinasas de la "región lisa" y la "región pilosa" no son adecuadas para tales procedimientos de prensado descritos, ya que licúan la pulpa y provocan grandes cantidades de sólidos en el zumo. La aplicación exclusiva de una poligalacturonasa específica en combinación con una actividad de pectina esterasa alta proporciona resultados de prensado mucho mejores, es decir, ciclos de prensado más cortos, rendimientos de prensado superiores y menos sólidos en el zumo. Por otra parte, el zumo contiene menos o nada de pectina residual, lo que mejora la despectinización y la filtración posteriores.

En el procesamiento de zumos claros, se requiere una 2ª etapa de procesamiento llamada "despectinización", en la que habitualmente se usan pectinasas tanto de la "región lisa" como de la "región pilosa". En principio, es necesario degradar todas las sustancias de alto peso molecular presentes (principalmente pectinas, almidón, etc.) a fin de conseguir un procedimiento de ultrafiltración optimizado. Las pectinasas usadas en los procedimientos de la técnica anterior no son satisfactorias en cuanto a su comportamiento a temperaturas superiores o la calidad del zumo obtenido.

Actualmente, no están disponibles pectinasas que sean activas a temperaturas superiores (> 60°C). Por otra parte, no están disponibles satisfactoriamente en la actualidad pectinasas usadas para el tratamiento de pulpa que den directamente un zumo claro después de prensar sin pectina residual. Se conocen enzimas pectinolíticas de la técnica anterior. Pectinasas de *Aspergillus* se divulgan, por ejemplo, en los documentos WO 94/14952 y WO 94/14966. Carbohydrate Research 338 (2003), 515-524, describe el aislamiento y la caracterización de dos isoformas de poligalacturonasa de *Trichoderma reesei* (ATCC 26920) pertenecientes a la familia 28 de glicosil hidrolasas. La enzima se caracteriza en lo relativo a sus propiedades de pH y temperatura. No se describe un uso particular de dichas poligalacturonasas.

El documento WO 03/012071 divulga secuencias de nucleótidos de *Aspergillus fumigatus* que codifican proteínas que exhiben actividades enzimáticas.

S.A. Mohamed y cols. "New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins", Carbohydrate Research 338 (2003) 515-524, divulga el aislamiento de dos isoenzimas extracelulares de poligalacturonasas de PG1 y PG2 procedentes de filtrados de cultivo de *Trichoderma reesei*.

Por consiguiente, hay una necesidad en la técnica anterior de enzimas pectinolíticas que sean adecuadas para el tratamiento de pulpa de frutas u hortalizas en lo relativo a un manejo más fácil en cuanto a las propiedades de temperatura y la gestión del procedimiento.

Según esto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la preparación de zumo de frutas u hortalizas. En particular, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la preparación de pulpa de frutas u hortalizas. El método de la invención ha de conducir a un rendimiento y una calidad mejores en lo relativo al zumo finalmente obtenido. Por otra parte, el procedimiento de la invención se debe poder poner en práctica a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas y también debe conducir a buenos resultados cuando el procedimiento se lleve a cabo a altas temperaturas. El procedimiento de la invención ha de mejorar la capacidad de extracción o la capacidad de degradación y, así, la capacidad de prensado de la pulpa. Ha de conducir a zumos con un bajo contenido de pectinas residuales después del prensado, es decir, se ha de mejorar la claridad de los zumos obtenidos y, así, evita filtraciones laboriosas. El procedimiento de la invención debe ser adecuado para diferentes frutas.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar genes que codifiquen enzimas pectinolíticas así como proporcionar las secuencias de polipéptidos que tengan actividad pectinolítica que sean adecuadas en el susodicho procedimiento. En particular, las secuencias de la invención son para codificar enzimas pectinolíticas que tengan un amplio intervalo de aplicación y que conduzcan a mejoras en el procedimiento del tratamiento de pulpa y la preparación de zumo de frutas u hortalizas.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que las pectinasas procedentes de *Trichoderma reesei* muestran excelente comportamiento en el tratamiento de pulpa de frutas u hortalizas y específicamente en el tratamiento de una pulpa procedente de frutas que contienen pectina soluble o poco esterificada. Específicamente, se ha encontrado que la poligalacturonasa de *Trichoderma reesei* (PGA1) muestra un excelente comportamiento en el tratamiento de pulpa de manzana. Sorprendentemente, se ha encontrado que la poligalacturonasa de *Trichoderma reesei* (PGA1) se puede usar como la única enzima para el tratamiento de una pulpa procedente de frutas que contienen pectina soluble o poco esterificada y el procedimiento se puede efectuar favorablemente a temperaturas elevadas. Se ha encontrado ahora que la poligalacturonasa de *Trichoderma reesei* PGA1 se puede usar favorablemente en combinación con enzimas pectinolíticas adicionales, como pectina metilesterasas, poligalacturonasas, pectina liasas, pectato liasas, arabinofuranosidasas, endoarabanasas o ramnogalacturonasas para mejorar el tratamiento de pulpa de fruta incluso procedente de frutas que tienen pectina muy esterificada o insoluble, en donde el procedimiento se ha de efectuar a una temperatura que sea compatible con las enzimas usadas.

La invención se refiere al uso de una o más enzimas pectinolíticas para el tratamiento de pulpa de frutas u hortalizas, en donde al menos una enzima pectinolítica es un polipéptido que tiene actividad pectinolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad y aún más preferiblemente al menos 98% de identidad con la secuencia del polipéptido de PGA1 según la SEQ ID NO:2 y b) un fragmento de a) que tiene actividad pectinolítica. En particular, la invención se refiere al uso de dicha poligalacturonasa procedente de *Trichoderma reesei* en el tratamiento de pulpa de manzana. Por otra parte, la invención se refiere al procedimiento para el tratamiento enzimático de pulpa de frutas u

5 hortalizas que comprende la etapa de añadir una o más enzimas pectinolíticas, en donde al menos una enzima pectinolítica es un polipéptido que tiene actividad pectinolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad y aún más preferiblemente al menos 98% de identidad con la secuencia del polipéptido de PAG1 según la SEQ ID NO:2 y b) un fragmento de a) que tiene actividad pectinolítica así como a un procedimiento para la preparación de un zumo de frutas u hortalizas que comprende dicho procedimiento para el tratamiento enzimático de pulpa de frutas u hortalizas, según se especifica anteriormente. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento enzimático de pulpa de manzana, en el que se usa una poligalacturonasa procedente de *Trichoderma reesei* que tiene la SEQ ID NO:2.

10 La invención, por otra parte, se refiere una molécula de DNA recombinante que al expresarse en una célula anfitriona procariótica o eucariótica codifica un polipéptido que tiene actividad de endopoligalacturonasa, comprendiendo dicha molécula de DNA recombinante una secuencia de DNA seleccionada de a) secuencias de DNA que tienen o que comprenden la SEQ ID NO: 1 (*pga1*), b) secuencias de DNA que tienen un grado de identidad de 70% a 98% con la secuencias de a) o c) secuencias de DNA que están relacionadas con las secuencias de a) o b) debido a la degeneración del código genético.

15 La invención también se refiere a un polipéptido que tiene actividad de endopoligalacturonasa codificada por el DNA recombinante anterior.

20 Para el propósito de la presente invención, el término "enzima pectinolítica" ha de comprender pectinasas, pectina esterases (o pectina metilesterases), poligalacturonasas, pectina liasas (o pectina transesterasas), pectato liasas (o pectato transesterasas), arabinofuranosidasas, endoarabanasas o ramnogalacturonasas.

25 Cuando se prepara una pulpa de frutas u hortalizas según la presente invención, la fruta u hortaliza en cuestión se tritura en primer lugar, a continuación la pulpa se trata con la enzima pectinolítica de la presente invención, a continuación la pulpa se prensa y el zumo así obtenido se pasteuriza opcionalmente y opcionalmente se trata adicionalmente con la enzima o las enzimas pectinolíticas y/o con otras enzimas adecuadas para la realización del procedimiento. En relación con esto, las características de temperatura de las enzimas adicionales que se van a usar se deben tener en cuenta con respecto a la realización global del procedimiento a temperaturas superiores.

30 La enzima pectinolítica se añade directamente durante o después de la trituración y en cantidades habituales en la técnica. La aplicación preferible es usar una preparación de pectinasa que consiste en 50.000 - 100.000 PGU/mg en una solución al 1 - 5%. La dosificación recomendada de la enzima es 50 - 100 g/t de frutas. La temperatura de reacción recomendada es 10 - 30°C, el tiempo de reacción es 30 - 120 minutos. El pH medio de la pulpa es 3,2 - 3,6.

La enzima pectinolítica se puede añadir en cualquier forma que sea conveniente y compatible con la realización del procedimiento.

35 La enzima pectinolítica se añade preferiblemente como una solución líquida concentrada o diluida.

La enzima pectinolítica es preferiblemente la poligalacturonasa procedente de *Trichoderma reesei* que tiene la SEQ ID NO:2.

40 El procedimiento descrito anteriormente es adecuado para el tratamiento de cualquier pulpa de frutas u hortalizas. Frutas adecuadas se seleccionan de manzanas, peras, uvas, uvas blancas, uvas rojas, bayas y ciruelas. El procedimiento es adecuado tanto para frutas que se procesan a temperaturas frías (p. ej. 10-30°C) como para frutas que se procesan a temperaturas altas (p. ej. 50°C). Hortalizas adecuadas se seleccionan de zanahorias y tomates. Otro material procesable puede incluir granos de café o cacao y pimienta.

45 Los resultados más favorables se obtienen cuando la pulpa de fruta es una pulpa de manzana y la enzima usada es poligalacturonasa procedente de *Trichoderma reesei*. Se obtienen resultados particularmente favorables cuando la pulpa de fruta es una pulpa procedente de frutas que contienen pectina poco esterificada y soluble como fresas o ciruelas. Se ha encontrado que en este caso se puede usar un zumo con alto rendimiento y alta calidad mediante el uso de PGA1 de *Trichoderma* como una única enzima. En el caso de frutas que contienen pectina muy esterificada y/o insoluble, puede ser necesario el uso de enzimas pectinolíticas adicionales en el procedimiento de preparación de un zumo correspondiente.

50 La invención también se refiere a las secuencias de DNA y proteínicas de una nueva enzima pectinolítica procedente de *Trichoderma reesei*. La secuencia es una endopoligalacturonasa (*pga1*), cuya secuencia se da en la lista de secuencias adjunta como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 2.

55 La invención también comprende variantes y derivados de dichas secuencias de DNA con tal de que codifiquen un polipéptido que tenga la actividad reivindicada. Específicamente, están comprendidas por la invención secuencias de DNA que se hibridan a la secuencia respectiva bajo condiciones restrictivas. Ejemplos de condiciones restrictivas son hibridación a 65°C, 18 h en solución de sulfato de dextrano (GenescreenPlus, Dupont), lavado de los filtros

durante 30 min., en primer lugar con 6 x SSC, dos veces con 2 x SSC, tres veces con 3 x SSC, con SDS al 0,1% y después de eso 0,2 x SSC a 65°C (método de transferencia con membrana y detección, Amersham).

5 Preferiblemente, la invención se refiere a un polinucleótido que tiene un grado de identidad de al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, aún más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 98% con la secuencia de *pga1* (SEQ ID NO: 1).

10 Por otra parte, la invención se refiere a secuencias de DNA que están relacionadas con las secuencias según la presente invención debido a la degeneración del código genético así como sus variantes alélicas. La degeneración del código genético puede resultar de una degeneración natural o de un uso especialmente seleccionado del codón. Variantes alélicas naturales se pueden identificar al usar técnicas de biología molecular muy conocidas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), o técnicas de hibridación.

Se puede usar una secuencia de DNA que codifica un polipéptido según la presente invención para transformar cualquier célula anfitriona, tal como células de hongos, levaduras, bacterias, plantas o mamíferos.

15 El grado de identidad se determina preferiblemente al detectar el número de residuos de la secuencia más corta que toma parte en la comparación y que tiene una pareja "apropiada" en la otra secuencia. A este respecto, homología se define como el grado de identidad. Para los propósitos de la presente invención, la identidad se determina preferiblemente del modo habitual usando algoritmos estándar. Según la presente invención, solo se usan para la comparación los cDNA de las proteínas respectivas y se determinaron parejas de secuencia similares, preferiblemente idénticas, como secuencias homólogas por medio de programas informáticos conocidos. Un ejemplo de tal programa es Clone Manager Suite, un programa que incluye la parte del programa Align Part y es vendido por Scientific & Educational Software, Durham, NC, EE. UU. de A. Bajo la opción "alineamiento local", este programa realiza una comparación de dos secuencias de DNA según se define anteriormente al usar bien el método FastScan - MaxScore o bien el método de Needleman-Wunsch y retener los valores por defecto. Según la presente invención, la versión del programa "Clone Manager 7 Align Plus 5" que incluye las funciones "Compare Two Sequences/Global/Compare DNA sequences" se usó especialmente para determinar el grado de identidad. En este caso, se usaron algoritmos disponibles de las siguientes fuentes: Hirschberg, D.S. (1975) A linear space algorithm for computing longest common subsequences, Commun. Assoc. Comput. Mach. 18:341-343; Myers, E.W. y W. Miller. (1988) Optimal alignments in linear space, CABIOS 4:1, 11-17; Chao, K-M, W.R. Pearson y W. Miller. (1992) Aligning two sequences within a specified diagonal band, CA-BIOS 8:5, 481-487.

30 La expresión de la secuencia o las secuencias de genes clonados da como resultado la producción de la proteína deseada, o la producción de un fragmento de esta proteína. Esta expresión puede tener lugar de un modo continuo en las células transformadas, o de un modo controlado. Se entiende que los fragmentos son partes de moléculas de polipéptido o ácido nucleico suficientemente largas para tener las propiedades enzimáticas deseadas o para codificar los polipéptidos pectinolíticos descritos o un fragmento biológicamente activo de los mismos. Preferiblemente, las secuencias de los fragmentos son las secuencias polipeptídicas maduras respectivas sin una secuencia de señal.

La invención se refiere a un polipéptido que tiene un grado de identidad de al menos 77%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, aún más preferiblemente al menos 95% y aún más preferiblemente al menos 98% con la secuencia del polipéptido de PGA1 (SEQ ID NO: 2).

40 Según se usa en el presente contexto, el término "identidad" de polipéptidos se refiere a la identidad global entre dos secuencias de aminoácidos comparadas entre sí desde el primer aminoácido codificado por el correspondiente gen hasta el último aminoácido. La identidad de las secuencias de longitud completa se mide usando el programa de alineamiento global de Needleman-Wunsch en el paquete de programas de EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice y cols., 2000), versión 3.0.0, con los siguientes parámetros: EMBL62, Penalización por hueco 10,0, Penalización por extensión 0,5. El algoritmo se describe en Needleman y Wunsch (1970) Journal of Molecular Biology 48, 443-453.

50 Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se han de considerar intercambiables. Un polipéptido o una enzima con actividad de endopoligalacturonasa, exopoligalacturonasa, exorranogalacturonasa o xilogalacturonasa indica una enzima que tiene dicha actividad según ensayos establecidos en la técnica. La invención también incluye variantes de las enzimas reivindicadas con tal de que retengan su actividad original. Una variante según la presente invención incluye variantes de polipéptidos que se derivan mediante eliminación o adición de uno o más aminoácidos al extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína natural; eliminación o adición de uno o más aminoácidos a uno o más sitios de la proteína natural; o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la enzima. La producción de tales variantes generalmente es muy conocida por los expertos en la técnica. Variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos se pueden producir, por ejemplo, mediante mutaciones en el DNA. Métodos de mutagénesis y cambios en la secuencia de nucleótidos son muy conocidos por los expertos en la técnica (cfr., por ejemplo, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985), Kunkel y cols., Methods in Enzymol., 154:367 (1987), la Patente de EE. UU. Nº 4.873.192, Walker y Gaastra, eds., Techniques in Molecular Biology, Mac Millan Publishing Company, Nueva York (1983)). Referencias sobre sustituciones apropiadas de aminoácidos, que

no influyen negativamente en la actividad biológica de la proteína de interés, se pueden encontrar en el modelo de Dayhoff y cols., Atlas of Protein Sequence and Structure, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C. (1978). Se prefieren las sustituciones conservativas, tales como intercambiar un aminoácido por otro con propiedades similares.

5 Este tipo de aminoácidos, que son intercambiables dentro de un grupo, se listan en la siguiente Tabla pero no se limitan a ella.

alifáticos	no polares	G A P M
		I L V F W
	polares y no cargados	C S T N Q Y
	polares y cargados	D E
aromáticos		K R H
		H F W Y

10 La invención también se refiere a preparaciones (composiciones) de ácido nucleico aisladas o esencialmente purificadas o preparaciones (composiciones) de proteína. A este respecto, un polinucleótido/polipéptido aislado y purificado o su segmento se refiere a un polinucleótido o polipéptido o su segmento que se presenta aislado de su ambiente natural. Un segmento aislado de un poli(ácido nucleico) o polipéptido se puede presentar en forma purificada o se puede presentar en un ambiente no natural, tal como en una célula anfitriona transgénica.

15 La presente invención también se refiere a casetes de expresión, que se pueden usar para introducir un marco de lectura abierto, que codifica una enzima pectinolítica según la invención, en una célula anfitriona. Preferiblemente, incluyen un promotor con una región de inicio de la transcripción, que está enlazado al marco de lectura abierto de la secuencia de DNA deseada. Tal casete de expresión puede incluir una variedad de sitios de escisión por restricción para la inserción del marco de lectura abierto y/u otros DNA, p. ej. una región reguladora de la transcripción y/o genes marcadores seleccionables. En la dirección 5'→3' de la transcripción, el casete de expresión incluye un promotor con una región de inicio de la transcripción y la traducción, la secuencia deseada de DNA y regiones de terminación de la traducción y la transcripción. Tal casete de expresión es funcional en una célula microbiana. La región de terminación puede ser natural para el promotor o el DNA en cuestión o se puede derivar de cualquier fuente diferente.

25 El término "marco de lectura abierto" (ORF, por sus siglas en inglés) se refiere a la secuencia de aminoácidos que es codificada entre los codones de inicio y parada de la traducción de una secuencia codificante. Los términos "codón de inicio" y "codón de parada" se refieren a una unidad de tres nucleótidos contiguos (codones) en una secuencia codificante, que especifican el inicio de la cadena y la parada de la cadena de la síntesis de proteínas (traducción de mRNA).

30 En relación con un ácido nucleico, "enlace funcional" se refiere a un compuesto como una parte de la misma molécula de ácido nucleico en una posición apropiada y con una orientación apropiada con respecto al inicio de la transcripción de la molécula. El DNA enlazado funcionalmente a un promotor está bajo la regulación del inicio de la transcripción del promotor. Las secuencias codificantes pueden estar enlazadas funcionalmente a una secuencia reguladora en orientación con sentido u orientación antisentido. Con referencia a los polipéptidos, "enlace funcional" se refiere a la conexión como una parte del mismo polipéptido, es decir por medio de uniones peptídico.

35 Según la presente invención, se puede usar cualquier promotor. Habitualmente, promotor se refiere a aguas arriba de la secuencia de nucleótidos con respecto a la secuencia codificante y controla la expresión de la secuencia codificante mediante el reconocimiento de la RNA polimerasa y otros factores que son necesarios para una transcripción correcta. El promotor usado según la presente invención puede incluir un promotor mínimo, es decir una secuencia corta de DNA de una secuencia TATA y otras secuencias que especifican el sitio de inicio de la transcripción al que los elementos reguladores están unidos para la expresión.

40 El promotor según la presente invención también puede incluir una secuencia de nucleótidos que comprende un promotor mínimo y elementos reguladores; este promotor mínimo puede verificar la expresión de una secuencia codificante o RNA funcional.

La invención también se refiere a vectores que incluyen el DNA según la presente invención. Estos vectores comprenden cualquier plásmido, cósmido, fago y otro vector en una forma lineal o circular bicatenaria o monocatenaria; estos vectores podrían transmitirse o movilizarse ellos mismos y pueden transformar un anfitrión

procariótico o eucariótico a través de la integración en el genoma celular o se presentan extracromosómicamente (p. ej. plásmidos que se replican autónomamente con un origen de replicación).

5 La construcción de vectores que se pueden usar según la presente invención es conocida por el experto debido a la susodicha divulgación (cfr., p. ej., Sambrook y cols., *Molecular Cloning: A Laboratory manual* (2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989)). El casete de expresión según la presente invención puede incluir uno o más sitios de enzimas de restricción para insertar la secuencia de nucleótidos, que codifica una enzima pectinolítica, bajo la regulación de una secuencia reguladora. El casete de expresión también puede incluir una señal de terminación funcionalmente enlazada al polinucleótido así como secuencias reguladoras, que son necesarias para la traducción apropiada del polinucleótido.

10 Seleccionar un vector de expresión apropiado depende de las células anfitrionas. Los vectores de expresión de levaduras u hongos pueden incluir un origen de replicación, un promotor y un mejorador apropiados así como cualquier sitio de unión ribosomal, sitio de poliadenilación, sitio donante y aceptor de empalme, secuencia de terminación de la transcripción y secuencias de flanqueo 5' no transcritas necesarios.

15 Ejemplos de células anfitrionas apropiadas son: células fúngicas del género *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Hypocrea*, *Neurospora*, *Mucor*, *Penicillium*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Fusarium* etc., tales como levaduras de los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Hansenula*, *Pichia* y otras de esta categoría. Sistemas anfitriones apropiados son, por ejemplo, hongos como *Aspergilli*, p. ej. *Aspergillus niger* (ATCC 9142) o *Aspergillus ficuum* (NRL 3135) o *Trichoderma* (p. ej. *Trichoderma reesei* QM6a y derivados del mismo) y levaduras como *Saccharomyces*, p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*, o *Pichia*, tal como *Pichia pastoris*, o *Hansenula*, p. ej. *H. polymorpha* (DSMZ 70277). Tales microorganismos se pueden obtener a partir de depositarios reconocidos, p. ej. American Type Culture Collection (ATCC), *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) o *Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) o cualquier otro depositario.

Adicionalmente al uso de un promotor especial, otros tipos de elementos pueden influir en la expresión de genes clonados. En particular, se mostró que los intrones tienen el potencial de mejorar la expresión génica.

25 El casete de expresión también puede incluir elementos adicionales, tales como elementos que pueden ser regulados por elementos endógenos o exógenos como proteínas con dedos de cinc, incluyendo proteínas con dedos de cinc naturales o proteínas con dedos de cinc quiméricas.

El casete de expresión usado según la presente invención también puede incluir elementos mejoradores o elementos promotores aguas arriba.

30 Los vectores usados según la presente invención se pueden construir de tal modo que incluyan un elemento mejorador. Así, las construcciones según la presente invención incluyen el gen de interés junto con una secuencia de DNA 3', que actúa como una señal para terminar la transcripción y para permitir la poliadenilación del mRNA así obtenido. Se puede usar cualquier secuencia de señal que permita la secreción desde el posible organismo anfitrión seleccionado. Las secuencias de señal más preferidas para la secreción desde hongos filamentosos son la secuencia de señal de glucoamilasa (glaA) o fitasa procedente de *Aspergillus niger*, la secuencia de señal de TAKA-amilasa procedente de *A. oryzae* y la secuencia de señal de celobiohidrolasa I procedente de *T. reesei*, o secuencias de señal derivadas de estas. Alternativamente, se podría usar la secuencia de señal de la proteína deseada.

40 También es posible usar una secuencia líder especial, puesto que la secuencia de DNA entre el sitio de comienzo de la transcripción y el comienzo de la secuencia codificante, es decir la secuencia líder no traducida, puede influir en la expresión génica. Secuencias líder preferidas incluyen secuencias que controlan la expresión óptima del gen ligado, es decir tienen una secuencia líder de consenso preferida que incrementa o conserva la estabilidad del mRNA y evita un inicio de la traducción inapropiado. La elección de tales secuencias es muy conocida para el experto en la técnica.

45 Tan pronto como se obtenga el casete de expresión o la secuencia de DNA según la presente invención, se puede insertar en vectores por medio de métodos conocidos para sobreexpresar el polipéptido codificado en sistemas anfitriones apropiados. Sin embargo, las propias secuencias de DNA también se pueden usar para transformar sistemas anfitriones apropiados de la presente invención para alcanzar una sobreexpresión del polipéptido codificado.

50 Tan pronto como una secuencia de DNA según la presente invención se exprese en una célula anfitriona apropiada en un medio adecuado, la enzima codificada se puede concentrar y/o aislar mediante métodos conocidos bien desde el medio si la enzima se secreta al medio o bien desde el organismo anfitrión si la enzima se presenta intracelularmente, o en el espacio periplasmático. Métodos conocidos para separar la biomasa y los sólidos del medio de cultivo seguidos por métodos para concentrar la enzima se pueden usar para la producción de soluciones enzimáticas concentradas o como una preparación para la deshidratación de la enzima.

55 La invención también se refiere a preparaciones que incluyen el polipéptido según la invención. En general, estas preparaciones son líquidas o secas. Las preparaciones líquidas incluyen preferiblemente la enzima en una forma

purificada o enriquecida. Sin embargo, se pueden añadir adyuvantes tales como un estabilizante con glicerol, sorbitol o propilenglicol, borato, aditivos tales como sales, un azúcar, conservantes, medios para ajustar el valor del pH, etc. Preparaciones líquidas típicas son suspensiones acuosas u oleosas. Según se usa en el presente contexto, la "preparación enzimática" se refiere a cualquier producto enzimático que contenga al menos una enzima pectinolítica de la invención. Así, tal preparación enzimática puede ser un medio de cultivo agotado o un filtrado. Un medio de cultivo agotado significa el medio de cultivo del anfitrión que comprende las enzimas producidas. Preferiblemente, las células anfitrionas se separan de dicho medio después de la producción. Si se desea, tales preparaciones se pueden secar por pulverización, granular o liofilizar o las preparaciones se pueden concentrar y/o estabilizar para el almacenamiento de otro modo. Si se requiere, una enzima deseada se puede purificar adicionalmente según métodos convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o similares.

Sin embargo, una ventaja de la invención es que el medio de cultivo con o sin células anfitrionas se puede utilizar como una preparación enzimática como tal sin purificación adicional, debido a que la enzima pectinolítica de la invención se puede secretar al medio de cultivo y presenta actividad en las condiciones ambientales del medio de cultivo agotado. El suministro y el uso de tales preparaciones enzimáticas son muy económicos, debido a que el aislamiento de una enzima específica del medio de cultivo es innecesario.

Además de la enzima pectinolítica, las preparaciones enzimáticas pueden comprender una o más de otras enzimas, que pueden ser, por ejemplo, otras celulasas, amilasas, lipasas, proteasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas y/o oxidasas tales como lacasas y peroxidasas.

Además de la enzima pectinolítica, la preparación enzimática puede contener aditivos tales como estabilizantes, tampones, conservantes, tensioactivos y/o componentes del medio de cultivo. Los aditivos preferidos son tales que se usan comúnmente en preparaciones enzimáticas destinadas a la aplicación en la que se usa la preparación enzimática.

Preparaciones secas pueden incluir preparaciones secadas por congelación, secadas por pulverización, instantaneizadas, granuladas o extruidas, que pueden comprender solamente la enzima o tener aditivos como almidón, dextrina, un azúcar, harina, una proteína o un aceite.

Las Figuras adjuntas son para ilustrar la invención con más detalle:

Figura 1. Imagen esquemática de los casetes de expresión usados en la transformación de protoplastos de *Trichoderma reesei* para sobreproducir las proteínas de pectinasa. Los genes de pectinasa están bajo el control de promotor de *cbh1* (*cel7A*) (*p cbh1*) de *T. reesei* y la terminación de la transcripción se aseguró al usar secuencia terminadora de *cbh1* (*t cbh1*) de *T. reesei*. Se incluyó bien el gen *amdS* o bien el gen *pyr4* como un marcador de selección de transformación.

Figura 2 A-C) Dependencias del pH de PG1 de *Aspergillus* (2A), PG2 de *Aspergillus* (2B) del estado de la técnica y la preparación de PGA1 de *Trichoderma* en bruto sobreproducida de la invención (2C) determinadas a diversos valores de pH (40°C, 60 min.).

Figura 2 D-F) Dependencia de la temperatura de PG1 de *Aspergillus* (2D), PG2 de *Aspergillus* (2E) del estado de la técnica y la preparación de PGA1 de *Trichoderma* en bruto sobreproducida de la invención (2F) determinadas a diversas temperaturas (2D y 2E pH 4,5, 2F pH 5,0, 60 min.).

Figura 3. Análisis por SDS-PAGE de la proteína de PGA1 de *Trichoderma reesei*. PM: marcador del peso molecular, carril 1: sobrenadante de cultivo de transformante que sobreproduce PGA1 de *Trichoderma* según se describe en el Ejemplo 3. Las bandas de proteína se visualizaron al teñir con azul brillante de Coomassie. El tamaño de la PGA1 de *Trichoderma* es aproximadamente 38 kDa.

Figura 4. A) Rendimiento de zumo después de prensar las preparaciones de pulpa de manzana tratadas con enzima. Se usó en el experimento una dosificación de 100 ppm de una mezcla que contenía 50.000 unidades de PG/mg de cualquiera de las PGA1 de *Trichoderma* (F050183 y F050200) o la PG1 de *Aspergillus* del estado de la técnica (REFERENCIA), todas suministradas con 2.000 unidades de PE/g de pectina metilesterasa de *A. niger*. En uno de los estudios con pulpa, no se añadió enzima (TESTIGO). El tiempo de incubación con enzima era 60 min. a 25°C.

B) Diagrama de prensado que muestra el rendimiento de zumo después de cada etapa a presión.

Figura 5. Turbidez (medida como NTU) del zumo después del tratamiento enzimático y el prensado. Se usó en el experimento una dosificación de 100 ppm de una mezcla que contenía 50.000 unidades de PG/mg de cualquiera de las PGA1 de *Trichoderma* (F050183 y F050200) o la PG1 de *Aspergillus* del estado de la

técnica (REFERENCIA), todas suministradas con 2.000 unidades de PE/g de pectina metilesterasa de *A. niger*. En uno de los estudios con pulpa, no se añadió enzima (TESTIGO). El tiempo de incubación con enzima era 60 min. a 25°C.

5 Figura 6. Una fotografía de los zumos de muestra después del tratamiento enzimático y el prensado. Muestras de izquierda a derecha: Testigo (sin enzima), F050183, F050200 y PG1 de *Aspergillus* del estado de la técnica como una referencia.

Figura 7. Rendimiento (%) del zumo obtenido de prensados de pulpas de diferentes frutas/hortalizas después del tratamiento con PGA1 de *Trichoderma reesei*.

10 La cepa de *E. coli* que incluía el plásmido pALK1958 (RF 6249) se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania, el 19 de julio de 2006 y se le asignó el número de registro DSM18450. El pALK1958 tiene el gen *pga1* de *Trichoderma* (Tabla 2) en un fragmento SacII-XhoI de 1.690 pb (que incluye 305 pb de la región 3' del gen) clonado en el vector pBluescript II SK+ cortado de forma similar.

Los siguientes Ejemplos no limitativos están destinados a ilustrar la materia de la presente invención con detalle.

15 Ejemplo 1: Cribado del genoma completo de enzimas proteolíticas de *T. reesei*

20 Se usaron métodos de biología molecular estándar en el aislamiento y los tratamientos enzimáticos de DNA (plásmidos, fragmentos de DNA), en transformaciones de *E. coli*, etc. Los métodos básicos usados se describen en los libros de texto de biología molecular estándar, p. ej. Sambrook y cols. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EE. UU. de A. y Sambrook y Russell (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EE. UU. de A.

La base de datos del genoma de *Trichoderma reesei* (el anamorfo de *Hypocrea jecorina*) (<http://gsphere.lanl.gov/trire1/trire1.home.html>) se buscó con las secuencias de diversas pectinasas de *Aspergillus* (Tabla 1) al usar el programa TBLASTN (Altschul y cols., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410).

25 Solo la búsqueda con endopoligalacturonasas de *A. niger*, exopoligalacturonasas de *A. tubingensis*, exoramnogalacturonasas putativas de *A. niger* y endoxilogalacturonasa de *A. tubingensis* producía aciertos con similitud significativa (inferior a e^{-20} a lo largo de al menos 80% de su longitud), dando como resultado la identificación de cuatro marcos de lectura abiertos diferentes (Tabla 2). Las regiones codificantes completas de estas secuencias se obtuvieron de <http://gsphere.lanl.gov/trire1/trire1.home.html>.

30

Tabla 1. Secuencias génicas de pectinasas de *Aspergillus* usadas en la explotación de la base de datos del genoma de *T. reesei*.

Nombre de la enzima	Genes	Nº de Registro
Endopoligalacturonasas de <i>A. niger</i>	<i>pgaA</i>	CAB72125
	<i>pgaB</i>	CAB72126
	<i>pgaC</i>	CAA45707
	<i>pgaD</i>	CAB72931
	<i>pgaE</i>	CAA74744
	<i>pgal</i>	CAA41693
	<i>pgall</i>	CAA41694
Pectina liasas de <i>A. niger</i>	<i>pelA</i>	CAA43130
	<i>pelB</i>	CAA46521
	<i>pelC</i>	AAW03313
	<i>pelD</i>	AAA32701
Pectato liasa de <i>A. niger</i>	<i>plyA</i>	CAC33162
Exopoligalacturonasa de <i>A. tubingensis</i>	<i>pgaX</i>	CAA68128
(Endo)-xilogalacturonasa de <i>A. tubingensis</i>	<i>xghA</i>	CAC07733
Ramnogalacturonasas de <i>A. niger</i>	<i>rhgA</i>	CAA63911
	<i>rhgB</i>	CAA63912
Exorramnogalacturonasas de <i>A. niger</i>	<i>rgxA</i>	ABD61566
	<i>rgxB</i>	ABD61567
	<i>rgxC</i>	ABD61568
Ramnogalacturonano liasa de <i>A. aculeatus</i>	<i>rhgB</i>	1NKG_A
Pectina metil-esterasa de <i>A. aculeatus</i>	<i>pme1</i>	AAB42153
Pectina metil-esterasa de <i>A. oryzae</i>	<i>pmeA</i>	BAA75474
Pectina metil-esterasa de <i>A. tubingensis</i>	<i>pmeA</i>	P17872
Ramnogalacturonano acetil-esterasa de <i>A. aculeatus</i>	<i>rha1</i>	CAA61858
Ramnogalacturonano acetil-esterasa de <i>A. niger</i>	<i>rgaeA</i>	CAC41360

Tabla 2. Pectinasa putativa que codifica genes identificados de la base de datos del genoma de *T. reesei*.

Gen	Modelo de gen / Id. Prot.	Andamiaje : Región (pb)	Identidad (%)
<i>pga1</i>	fgenes5_pg.C_ scaffold_1000682 /103049	1 : 2495262-2496642	Poligalacturonasa de <i>A. fumigatus</i> EAL91052; 76% de identidad Endopoligalacturonasa de <i>A. nidulans</i> ABF50893; 74% de identidad
*	fgenes5_pg.C_ scaffold_33000038 / 112140	33 : 88035-89368	Exopoligalacturonasa de <i>F. oxysporium</i> BAE97149; 56% de identidad Exopoligalacturonasa de <i>A. nidulans</i> ABF50895; 54% de identidad
*	estExt_fgenes5_ pg.C_150014 / 122780	15 : 45898-47405	Exorramnogalacturonasa de <i>A. niger</i> 42% de identidad Exopoligalacturonasa de <i>A. fumigatus</i> EAL86831; 40% de identidad
*	e_gw1.33.41.1 / 70186	33 : 90062-91279	Proteína sin nombre procedente de <i>A. oryzae</i> BAE61127; 54% de identidad Exopoligalacturonasa de <i>A. fumigatus</i> XP_747488; 53% de identidad
<i>rgx1</i>			
<i>xga1</i>			

* de referencia

El análisis de las secuencias proteínicas derivadas con InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>, Apweiler y cols., 2000 Bioinformatics 16(12):1145-50) las identificó como miembros de la familia 28 de glucósido hidrolasas (GH28; n° reg. InterPro PF00295). Las secuencias que codifican pectinasa putativa procedentes de *T. reesei* mostraban todas la homología más cercana a enzimas procedentes de otros hongos implicados en la degradación de pectina (búsqueda BLASTP, Altschul y cols., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410, Tabla 2) y por consiguiente se denominaron *pga1* (endopoligalacturonasa), *pgx1* (exopoligalacturonasa), *xga1* (xilogalacturonasa) y *rgx1* (exorramnogalacturonasa). La identificación se verificó adicionalmente mediante un enfoque filogenético (Mega 3.1, Kumar y cols., 2004 MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 5:150-163). Tres secciones "que no son endopoligalacturonasa" del árbol filogenético formaban de ese modo cuatro ramas. La PGX1 se encuentra en una rama que también contiene las exopoligalacturonasas procedentes de *A. niger*, *A. tubingensis* y *Cochliobolus carbonum* ya caracterizadas. La XGA1 es la más similar a una rama pequeña, en la que una hidrolasa de xilogalacturonano de *A. tubingensis* es la única enzima caracterizada. La XGA1 comparte menos similitud con las otras secuencias de esa rama que la que estas muestran entre sí y, por lo tanto, es posible que la enzima de *T. reesei* haya desarrollado algunas características únicas. Lo mismo se aplica a RGX1, que muestra el grado más alto de identidad de secuencia con exorramnogalacturonasas putativas. En la rama correspondiente, solo se ha probado una enzima procedente de *A. niger* con respecto a su funcionalidad sin determinar el mecanismo de reacción exacto (Martens-Uzunova, E. S., Zandleven, J. S., Benen, J. A., Awad, H., Kools, H. J., Beldman, G., Voragen, A. G., Van den Berg, J. A. & Schaap, P. J. (2006) A new group of exoacting family 28 glycoside hydrolases of *Aspergillus niger* that are involved in pectin degradation, Biochem J. 400, 43-52).

Ejemplo 2: Clonación de los genes de pectinasa de *T. reesei* identificados

Los genes *pga1*, *pgx1*, *rgx1* y *xga1* se amplificaron a partir de DNA genómico de *T. reesei* usando el sistema GoTaq® (Promega, EE. UU. de A.) con MgCl₂ 2 mM y 0,4 µM de cebadores específicos de la secuencia presentados en la Tabla 3. Las condiciones para la reacción de PCR eran las siguientes: etapa de desnaturalización inicial de 2 min. a 95°C, seguido por 28 ciclos de 1 min. a 95°C, 45 s de renaturalización a la temperatura específica del cebador (Tabla 3_TP), 2 min. de extensión a 72°C y un alargamiento final a 72°C durante 5 min. Los fragmentos de DNA de los tamaños esperados se aislaron y a continuación se clonaron al vector pBlueScript II SK+ (Stratagene, EE. UU. de A.). Las inserciones se caracterizaron mediante secuenciación.

Tabla 3. Los cebadores usados para amplificar los genes de pectinasa de *T. reesei*. El DNA genómico de QM9414 de *T. reesei* se usó como una plantilla en las reacciones de PCR. Se muestra el nombre del plásmido que contiene el fragmento de gen amplificado.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia 5' -> 3'	T _m ^(a) [°C]	Plásmido
<i>pga1</i>	Directo: C22000155for SEQ ID NO: 9	GATCCCGCGGCAACATGCTCAA GCTATCAC	50	pALK1958
	Inverso: C22000155rev SEQ ID NO: 10	GATCCTCGAGCATTCTTCACGG CATTCTAC		
*	<i>pgx1</i>	Directo: C42000032fw SEQ ID NO: 11	49	pALK1961
		Inverso: C42000032rv SEQ ID NO: 12		
*	<i>xga1</i>	Directo: C42000033fw SEQ ID NO:13	51	pALK1964
		Inverso: C42000033rv SEQ ID NO: 14		
*	<i>rgx1</i>	Directo: C12000223fw SEQ ID NO: 15	58	pALK1970 ^(b) /pALK1971
		Inverso: C12000223rv SEQ ID NO: 16		

* de referencia

5 ^(a) Temperatura de renaturalización usada para amplificar el gen de pectinasa de *T. reesei*.

^(b) La región codificante del gen *rgx1* de longitud completa consistía en dos plásmidos.

La información pertinente sobre los genes de pectinasa y las secuencias proteínicas deducidas se resumen en la Tabla 4 y la Tabla 5, respectivamente.

Tabla 4. Resumen de los genes de pectinasa de *T. reesei*.

Gen de pectinasa	Longitud con intrones (pb) ^(a)	Región codificante (pb) ^(b)	Nº de intrones	Longitudes de los intrones (pb)
<i>pga1</i>	1381	1137	4	64, 59, 59, 59
<i>pgx1</i>	* 1421	1311	2	50,57
<i>xga1</i>	* 1218	1215	0	
<i>rgx1</i>	* 1374	1371	0	

* de referencia

^(a) Se incluye el codón de PARADA.

^(b) No se incluye el codón de PARADA.

Tabla 5. Resumen de las secuencias de pectinasa de *T. reesei* deducidas.

Proteína de CBH	Nº de aa	Longitud de NN/HMM ^(a)	PM predicho (Da, ss no incl.) ^(b)	PI predicho (ss no incl.)	Sitios de N-glicosilación putativos ^(c)
PGAI	379	21/21	36.187	5,51	3
PGXI *	437	22/22	45.559	5,51	12
XGAI *	405	18/18	40.023	7,10	8
RGXI *	457	17/21	48.700 ^(d) /48 340	4,79	7

5 * de referencia

^(a) La predicción de la secuencia de señal (ss) se realizó usando el programa SignalP V3.0 (Nielsen y cols., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10:1-6; Bendtsen y cols., 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol. 340:783-795); el valor NN se obtuvo usando redes neuronales y el valor HMM usando modelos de Markov ocultos.

10 ^(b) La secuencia de señal no se incluyó. La predicción se realizó usando la herramienta Compute pI/MW en el servidor ExPASy (Gasteiger y cols., 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31:3784-3788).

^(c) El número de secuencias N-X-S/T.

^(d) Los valores marcados para RGXI se calculan después de eliminar dos posibles secuencias de señal.

15 Los residuos de aminoácido que se presentó que eran cruciales para la acción catalítica de la endopoligalacturonasa II de *A. niger* (van Santen y cols., 1999. 1.68-A crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 274:30474-30480; Armand y cols., 2000. The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis. J Biol Chem. 275:691-696) también se identifican en PGAI, PGXI y XGAI de *T. reesei*. Esto indica propiedades catalíticas similares de las enzimas pectinasa de *T. reesei* a las de *A. niger*. Además de la firma del sitio activo típica de glucósido hidrolasas GH28, PGAI, PGXI y XGAI, contienen varios dominios PbH1 (repeticiones de hélice β paralelas), que también se encuentran en varios tipos de enzimas pectinolíticas (Jenkins & Pickersgill, 2001. The architecture of parallel beta-helices and related folds. Prog Biophys Mol Biol. 77:111-175.). Los hallazgos confirmaron además las características pectinolíticas de los genes de *T. reesei* indicados aquí.

25 Ejemplo 3: Sobreexpresión de los genes de pectinasa en *Trichoderma reesei*

Se construyeron plásmidos de expresión para la sobreexpresión de los genes de pectinasa de *T. reesei*. Los plásmidos de expresión construidos se listan en la Tabla 6. Los genes *pga1*, *pgx1*, *rgx1* y *xga1*, incluyendo sus propias secuencias de señal, se fusionaron exactamente al promotor de *cbh1* de *T. reesei* (*cel7A*). La terminación de la transcripción se aseguró mediante el terminador *sw cel7A* de *T. reesei* y se usó el gen marcador *amdS* de *A. nidulans* para la selección de los transformantes que se describen en Paloheimo y cols. (2003) High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. Appl. Env. Microbiol. 69:7073-7082). Los casetes de expresión lineales (Fig. 1) se aislaron de las cadenas principales de los vectores después de la digestión con *NotI* y se transformaron en protoplastos RF5455 de *T. reesei* (la cepa tiene los genes que codifican las dos celulasas principales CBH1/Cel7A y EGII/Cel5A eliminadas).

El plásmido de expresión incluyendo el gen marcador *pyr4* endógeno también se construyó para el gen *pga1* al ligar el fragmento genómico *XbaI-HindIII* de 4,7 kb del locus *pyr4* de *T. reesei* después del terminador de *cel7A* en el plásmido. El casete de expresión lineal se aisló de la cadena principal del vector después de la digestión con *NotI* y se transformó en protoplastos RF5514 de *T. reesei* (la cepa tiene los genes que codifican las dos celulasas principales CBH1/Cel7A y EGII/Cel5A eliminadas también es un auxótrofo de pirimidina).

Las transformaciones se realizaron como en Penttilä y cols. (1987, A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 61:155-164) con las modificaciones descritas en Karhunen

y cols. (1993, High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522), bien seleccionando la acetamida como una única fuente de nitrógeno (gen marcador *amdS*) o bien sin suplemento de uridina (gen marcador *pyr4*). Los transformantes se purificaron en placas de selección a través de un solo conidio antes de esporularlos en PD.

- 5 Tabla 6. Los casetes de expresión contruidos para sobreproducir proteínas de pectinasa en *Trichoderma reesei*. La estructura global de los casetes de expresión era como se describe en la Fig. 1. Los genes *pga1*, *pgx1*, *rgx1* y *xga1* clonados se fusionaron exactamente al promotor *cbh1/cel7A* de *T. reesei*.

Pectinasa de <i>T. reesei</i>	Plásmido de expresión	Tamaño del casete de expr. ^(a)	Terminador <i>cbh1</i> ^(b)
PGAI	pALK1967	9.0 kb	627 pb (Avall)
	(<i>amdS</i> ^(c)) pALK1960 (<i>pyr4</i> ^(c))	10.0 kb	
PGXI *	pALK1968	9.2 kb	627 pb (Avall)
RGXI *	pALK1974	8.8 kb	627 pb (Avall)
XGAI *	pALK1969	8.6 kb	627 pb (Avall)

* de referencia

10 ^(a) El casete de expresión para la transformación de *T. reesei* se aisló del esqueleto del vector al usar digestión con *NofI*.

^(b) El número de los nucleótidos de la región terminadora de *cbh1* después del codón de PARADA. El sitio de restricción en el extremo 3', usado para escindir el fragmento génico genómico, se incluye entre paréntesis.

^(c) Se construyeron dos plásmidos de expresión para el gen *pga1*; el plásmido pALK1967 incluía el gen marcador *amdS* para la selección del transformante, y el pALK1960 incluía el gen marcador *pyr4*.

15 La producción de pectinasa de los transformantes se analizó a partir de los sobrenadantes de cultivo de los cultivos en matraz agitado (50 ml). Los transformantes se hicieron crecer durante 7 días en un medio complejo inductor de celulasa basado en lactosa (Joutsjoki y cols. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resiniae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 24:223-228) tamponado con KH_2PO_4 al 5%. La actividad de poligalacturonasa se ensayó mediante un método viscosimétrico usando pectina de cítrico (Copenhagen pectin X-2955, Dinamarca) como el sustrato, según se describe en la patente EP0388593. Una unidad de poligalacturonasa (PGU, por sus siglas en inglés) se define como la cantidad de enzima que provocaba una reducción de 15 nPas^{-1} en la viscosidad bajo condiciones estándar. Los genotipos de los transformantes elegidos se confirmaron usando inmunotransferencias Southern en las que se incluyeron varios digestos genómicos y se usó el casete de expresión respectivo como una sonda. La sobreexpresión de las proteínas de PGAI, PGXI, RGXI y XGAI se analizó mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie posterior. La proteína de PGAI se sobreproducía notablemente en *T. reesei* (véase la Figura 3), mientras que no se podía detectar actividad de PGU o sobreproducción de proteína visible en SDS-PAGE para los transformantes PGXI, RGXI y XGAI que, sin embargo, demostraron contener un casete de expresión integrado. Esto sugiere que se produce una cantidad muy baja de las proteínas de PGXI, RGXI y XGAI en *T. reesei*.

30 Los transformantes de PGAI elegidos se cultivaron en biorreactores de laboratorio a 28°C en el medio indicado anteriormente durante 3-4 días con control del pH $4,4 \pm 0,2$ ($\text{NH}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$) para obtener material para las pruebas de aplicación. Los sobrenadantes se recuperaron mediante centrifugación y filtración a través de filtros Seitz-K 150 y EK (Pall SeitzSchenk Filter-systems GmbH, Bad Kreuznach, Alemania). Se produjeron dos preparaciones con perfiles enzimáticos idénticos (PGA1+++ , CBHI-, EGII-). Se produjo F050183 con transformante derivado de RF5514 y F050200 con transformante derivado de RF5455; el primero se seleccionó con el marcador *pyr4* y el último con el marcador *amdS*. Así, la cepa anterior solo tiene DNA homólogo.

Ejemplo 4: Caracterización de la enzima PGAI de *T. reesei*

La enzima PGAI de *T. reesei* en bruto se caracterizó en cuanto al óptimo de pH y la estabilidad térmica.

40 La dependencia del pH de la proteína de PGAI de *T. reesei* sobreproducida (muestra F 050183) se determinó dentro de un intervalo de pH de 3,0-8,0 al preparar el tampón de muestra al mezclar ácido cítrico 0,1 M y Na_2HPO_4 0,2 M (ambos complementados con 100 microgramos/ml de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (Fluka, N° Cat. 05470) hasta el pH deseado. La actividad se ensayó al pH deseado con incubaciones de 60 min. La Fig. 2A-C muestra los resultados. Las enzimas de *Aspergillus* tienen un óptimo de pH alrededor de 4,5, mientras que

la PGA1 de *Trichoderma* tiene un óptimo de pH ligeramente más neutro a pH 5,0. La PGA1 de *Trichoderma* todavía retiene aproximadamente 70% de actividad a pH 5,5, al que a la PG1 de *Aspergillus* solo le queda 30% de la actividad máxima. La PG2 de *Aspergillus* pierde su actividad a pH 5,5.

5 La dependencia de la temperatura de la proteína de PGA1 de *Trichoderma* sobreproducida (muestra F050183) se determinó a pH 5,0 dentro del intervalo de 40°C - 75°C, y se comparó con la PG1 y la PG2 de *Aspergillus* del estado de la técnica ensayadas a su pH 4,5 óptimo. Sorprendentemente, la PGA1 de *Trichoderma* tiene un óptimo de alta temperatura a aproximadamente 65°C, y todavía aproximadamente 60% de la actividad máxima a 70°C, mientras que a las enzimas de *Aspergillus* virtualmente no les queda actividad a 65°C (Fig. 2D-F), y tienen su óptimo alrededor de 50°C (aproximadamente 15°C menos que PGA1 de *Trichoderma*).

10 Método colorimétrico para la actividad de PG

Para las determinaciones de la dependencia del pH, el ensayo se llevó a cabo al pH deseado del sustrato y el tampón de muestra a 40°C durante 60 min. Para las determinaciones de la dependencia de la temperatura, el ensayo se llevó a cabo a pH 4,5 para las muestras de *Aspergillus* ('13 y '22) y pH 5,0 para la muestra de PGA1 de *T. reesei*. Los ensayos se llevaron a cabo a la temperatura deseada durante 60 min.

15 Sustrato: Pectato potásico al 0,7% (p/v) (Fluka, N° Cat. 51186). Se disolvieron 0,7 g de sustrato en 100 ml de agua caliente. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el valor del pH se ajustó con ácido acético o hidróxido sódico.

Solución en enzima: Las enzimas se diluyeron en el tampón de muestra.

Reactivo PAHBAH:

20 Solución de reserva (5%) Se disolvieron 50 g de p-hidroxibenzhidacida 98% (Fluka N° Cat 54600) en 1.000 ml de ácido clorhídrico 0,5 M.

Solución de trabajo: Se disolvieron 0,233 g de Titriplex III en 30 ml de hidróxido sódico 0,5 M.

Se añadieron 5 ml de solución de reserva y se completaron hasta 50 ml con NaOH 0,5 M

Volúmenes de ensayo:

Sustrato:	0,25 ml
Encima:	0,1 ml
PAHBAH:	0,65 ml
Temperatura de incubación del color:	80°C
Duración de la incubación del color:	15 min

25 Valor de la muestra:

El sustrato se pipeteó en un tubo de ensayo. La reacción se inició al añadir la solución de enzima. La partida se mezcló y se incubó a 40°C durante 60 min. Después de la incubación, la reacción se detuvo al añadir el reactivo PAHBAH. Para el desarrollo del color las muestras se incubaron durante 15 min. a 80°C. Posteriormente, las muestras se enfriaron en un baño de hielo durante aproximadamente 5 min. y se centrifugaron (2 min., 13.000 rpm).

30 Los sobrenadantes se midieron fotométricamente contra la muestra testigo a 412 nm.

Testigo:

Se mezclaron el sustrato y el reactivo PAHBAH. Después de añadir la solución de enzima las muestras se incubaron durante 60 min. a 40°C y a continuación durante 15 min. a 80°C para el desarrollo del color. El enfriamiento, la centrifugación y la medida fotométrica se realizaron como para los valores de muestra.

35

Ejemplo 5: Preparación de zumo de manzana

Los sobrenadantes de cultivo libres de células se probaron en la preparación de zumo de manzana. Para este propósito, se trituraron manzanas elegidas (variedad de cultivo Golden Delicious) y 500 g de la pulpa de manzana resultante se usaron en el experimento. Después de la adición de enzima, la pulpa se incubó 60 min. a temperatura ambiente (25°C), y a continuación la pulpa se prensó con una prensa de laboratorio (Hafico). La norma de prensado fue 2 minutos a 50, 100, 150 y 200 bar, seguido por 1 minuto a 300 y 400 bar, respectivamente.

Dos preparaciones de PGA1 de *Trichoderma* F050183 (RF5514 / pALK1960/#4 de *T. reesei*) y F050200 (RF5455 / pALK1967/#4 de *T. reesei*) se compararon con el producto del estado de la técnica que contenía PGI de *Aspergillus* (muestra de referencia). Las tres muestras se complementaron con pectina metilesterasa de *Aspergillus*. La actividad de poligalacturonasa se ensayó mediante un método viscosimétrico usando pectina de cítrico (Copenhagen pectin X-2955, Dinamarca) como el sustrato, según se describe anteriormente y en la patente EP0388593. Una unidad de poligalacturonasa (PGU) se define como la cantidad de enzima que provocaba una reducción de 15 nPas^{-1} en la viscosidad bajo condiciones estándar. Se usó en el experimento una dosificación de 100 ppm de una mezcla que tenía 50.000 unidades de PG/mg bien de las PGA1 de *Trichoderma* o bien de la referencia, complementadas con 2.000 unidades de PE/g (patente EP0388593). En uno de los estudios, no se añadió enzima (muestra testigo).

Los resultados del rendimiento de zumo (Fig. 4) muestran que la PGA1 de *Trichoderma* es igual o mejor que la preparación de pectinasa del estado de la técnica. En particular, la turbidez de las muestras tratadas con PGA1 de *Trichoderma* fue superior, es decir, los zumos tratados con PGA1 de *Trichoderma* eran mucho más claros y transparentes en comparación con el zumo tratado con PG de *Aspergillus* del estado de la técnica (Fig. 5). El resultado es claramente visible (Fig. 6).

La prueba de alcohol para la pectina restante (1+1 volumen de zumo y etanol absoluto) mostró después de 6 h de incubación a 25°C que los zumos tratados con PGA1 de *Trichoderma* no contenían pectina residual, mientras que el zumo tratado con PG de *Aspergillus* contenía algo de pectina residual. En la muestra testigo, se encontraron cantidades considerables de pectina residual.

Ejemplo 6: Prueba de PGA1 de *Trichoderma* en la preparación de zumo de diferentes frutas y hortalizas.

La preparación de PGA1 de *Trichoderma* F050183 producida como se describe en el Ejemplo 3 se probó en la preparación de zumo de frutas y hortalizas son pectina metilesterasa añadida .

Fresas y frambuesas se convirtieron en pulpa manualmente con un dispositivo metálico. Ciruelas y zanahorias se trituraron mecánicamente con una picadora. Las zanahorias se blanquearon mediante calentamiento con microondas a 95°C. 1.000 g de pulpa se pusieron en una botella de 2.000 ml y la temperatura se ajustó durante 20 min. antes de añadir la solución de enzima. La temperatura de reacción fue 65°C y el tiempo de reacción 60 min. La conversión en pulpa después de la reacción enzimática se realizó prensando en una prensa de laboratorio Hafico usando telas de pensado. El zumo recibido se recogió en un matraz Imhoff para la sedimentación.

Enzima y dosificación:

La dosificación se basó en la recomendación general de la técnica: 200 ppm a 30.000 PGU/mg corresponde a $6 \cdot 10^6$ PGU/kg de zanahorias, ciruelas, fresas y frambuesas. La actividad de la preparación enzimática FEA 2005027 fue 10.300 PGU/mg. La dosificación de la preparación enzimática FEA 2005027 por 1.000 g de zanahorias fue así 0,58 g. La prueba testigo era sin una dosificación de enzima.

El diagrama de prensado usado era el siguiente:

1 min. llenado - 2 min. 0 bar - 2 min. 50 bar - 2 min. 100 bar - 2 min. 150 bar - 2 min. 200 bar - 1 min. 300 bar - 1 min. 400 bar.

La medida de la turbidez (NTU) se llevó a cabo con un fotómetro de turbidez de laboratorio Dr Lange LTP5 a 860 nm. Los valores se presentan como NTU (unidades de turbidez nefelométrica, por sus siglas en inglés) sobre la base del método DIN 38404. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de prueba con preparación de zumo de frambuesas, fresas, ciruelas y zanahorias

	Rendimiento de zumo	Rendimiento de zumo	*Brix	Turbidez	Turbidez	Sedimento
	[g]	[%]		NTU	24h NTU	[%]
Prueba testigo en frambuesas	795	79,5	9,4	58	58	1,0
Frambuesa F050183	789	78,9	9,4	50	52	1,3
Prueba testigo en fresas	803,9	80,39	6,3	170	79	12,2
Fresa F050183	906	90,6	6,3	183	56	14,5
Prueba testigo en ciruelas	543	54,3	15	157	142	20,0
Ciruelas F050183	764	76,4	17,2	143	124	9,0
Prueba testigo en zanahorias	742	74,2	9,5	161	17,8	8,3
Zanahorias F050183	723	72,3	9,5	150	72	7,7

La tabla 7 anterior muestra que el tratamiento de fresas y ciruelas con PGA1 de *Trichoderma* incrementó el rendimiento de zumo y °Bx (contenido de azúcar) sin pectina esterasa ni otras actividades pectinolíticas.

- 5 Los resultados se presentan gráficamente en la Figura 7. La Figura 7 muestra el rendimiento de un zumo obtenido del prensado de pulpas de diferentes frutas/hortalizas después del tratamiento con PGA1 de *Trichoderma reesei*. Los resultados se muestran en comparación con los valores testigo respectivos.

- 10 Sorprendentemente, la PGA1 de *Trichoderma* daba un resultado superior con frutas que contenían pectina que es poco esterificada y soluble. Basándose en los resultados presentados anteriormente, es posible llevar a cabo el tratamiento de dicha pulpa de fruta solo con la enzima PGA1 de *Trichoderma* a 65°C en una hora sin pectinasas adicionales. Este resultado superior no se podía esperar.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> AB Enzymes GmbH
- <120> Uso de enzimas pectinolíticas para el tratamiento de pulpa de frutas y secuencias enzimáticas para las mismas
- 5 <130> 17405WO
- <160> 16
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- < 211> 1381
- 10 < 212> DNA
- < 213> Trichoderma reesei endopoligalacturonasa (pga 1)
- <220>
- < 221> CDS
- < 222> (1)..(252)
- 15 <220>
- < 221> CDS
- < 222> (317)..(739)
- <220>
- < 221> CDS
- 20 < 222> (799)..(928)
- <220>
- < 221> CDS
- < 222> (988)..(1072)
- <220>
- 25 < 221> CDS
- < 222> (1132)..(1378)
- <400> 1

ES 2 564 083 T3

atg ctc aag cta tca ctt ttt ctc gga gct gtt aca gct tca ctc tgc 48
Met Leu Lys Leu Ser Leu Phe Leu Gly Ala Val Thr Ala Ser Leu Cys
1 5 10 15

gtg caa gct cac gct gtg cct ccg ccc acc gtc acc caa gca ccc aag 96
Val Gln Ala His Ala Val Pro Pro Thr Val Thr Gln Ala Pro Lys
20 25 30

ctc gaa gat cga gcc acc acc tgc acc ttc tcc ggc tcc aat ggc gca 144
Leu Glu Asp Arg Ala Thr Thr Cys Thr Phe Ser Gly Ser Asn Gly Ala
35 40 45

tcg tcg gcg agc aag tcg cag aag tcg tgt gcg acc att gtg ctc tcg 192
Ser Ser Ala Ser Lys Ser Gln Lys Ser Cys Ala Thr Ile Val Leu Ser
50 55 60

aac gtt gcc gtt cct tct ggg gtg acg ctc gat ctc agt gat ttg aac 240
Asn Val Ala Val Pro Ser Gly Val Thr Leu Asp Leu Ser Asp Leu Asn
65 70 75 80

gat ggc acg acc gtaagcatcg aaacaatgag ataaatctcc atgagatgct 292
Asp Gly Thr Thr

actgacttgg attgatatat gtag gtc atc ttc gag ggc acc acg act tgg 343
Val Ile Phe Glu Gly Thr Thr Trp
85 90

ggc tac aag gaa tgg tcc ggc cct ctc ctc cag atc gaa ggc aac gac 391
Gly Tyr Lys Glu Trp Ser Gly Pro Leu Leu Gln Ile Glu Gly Asn Asp
95 100 105

atc acc atc caa ggc gcc agc ggt gct gtt ctg aac ccc gat ggc gcc 439
Ile Thr Ile Gln Gly Ala Ser Gly Ala Val Leu Asn Pro Asp Gly Ala
110 115 120 125

cgt tgg tgg gat ggc caa gga ggc aac ggc ggc aag acg aag ccc aag 487
Arg Trp Trp Asp Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Lys Thr Lys Pro Lys
130 135 140

ttc ttt gct gcc cat gat ctg acc tcc tcg tcc atc acc aac ttg tat 535
Phe Phe Ala Ala His Asp Leu Thr Ser Ser Ser Ile Thr Asn Leu Tyr
145 150 155

atc aag aac acg cca gtt cag gcc gtc agc gtt aat ggt gtg aat ggg 583
Ile Lys Asn Thr Pro Val Gln Ala Val Ser Val Asn Gly Val Asn Gly
160 165 170

ctg act att act ggc atg aca att gac aac agc gct ggt gat agt ggt 631
Leu Thr Ile Thr Gly Met Thr Ile Asp Asn Ser Ala Gly Asp Ser Gly
175 180 185

ggc gga cac aat aca gac ggc ttt gat att ggc tct agc tcc aat gtc 679
Gly Gly His Asn Thr Asp Gly Phe Asp Ile Gly Ser Ser Ser Asn Val
190 195 200 205

gtg att agc gga gcc aag gtt tat aac caa gat gac tgc gtt gct gtc 727
Val Ile Ser Gly Ala Lys Val Tyr Asn Gln Asp Asp Cys Val Ala Val
210 215 220

aat tct ggc acg gtaagaaaca gccgaacaaa cagatgaagc ggccggcgca 779
Asn Ser Gly Thr
225

tttgactgac atgatatag aac atc acc ttc act ggg ggt ctt tgc tcc gga 831
Asn Ile Thr Phe Thr Gly Gly Leu Cys Ser Gly
230 235

ggc cac ggc ttg tca atc ggc agt gtt ggc ggt cga gac gac aac aca 879
Gly His Gly Leu Ser Ile Gly Ser Val Gly Gly Arg Asp Asp Asn Thr
240 245 250

gtc caa aca gtc aca ttt tcc aac tcg cag gtc act aaa tca gcc aat g 928
Val Gln Thr Val Thr Phe Ser Asn Ser Gln Val Thr Lys Ser Ala Asn
255 260 265

gtcagtatac ttgtcacaca agactttcaa ggtagaggt taatctaacc tgccttcag 987

gc atc cgt atc aag gcc acc gcc ggt aaa act ggc acc atc aag gga 1034
Gly Ile Arg Ile Lys Ala Thr Ala Gly Lys Thr Gly Thr Ile Lys Gly
270 275 280

gtc acc tac act ggc att act ctg tcc tcg atc aca gg gtaagtcaaa 1082
Val Thr Tyr Thr Gly Ile Thr Leu Ser Ser Ile Thr Gly
285 290 295

gatgtaatct ggacgcagtt tctgggcctc ctctgacact tcataacag c tac gga 1138
Tyr Gly

ES 2 564 083 T3

att ctg att gag caa aac tac gac ggt ggt gat ctt cat gga agc cca 1186
 Ile Leu Ile Glu Gln Asn Tyr Asp Gly Gly Asp Leu His Gly Ser Pro
 300 305 310 315

acg agc ggc atc ccc atc acc aac ctg gtg ctg cag aac atc tct gga 1234
 Thr Ser Gly Ile Pro Ile Thr Asn Leu Val Leu Gln Asn Ile Ser Gly
 320 325 330

agc aac ggt gtt gta tcc agt gga aac aac att gcc atc gtc tgt ggc 1282
 Ser Asn Gly Val Val Ser Ser Gly Asn Asn Ile Ala Ile Val Cys Gly
 335 340 345

agt gga gct tgt tcc aac tgg act tgg agc aat gtc gtc gtc act ggc 1330
 Ser Gly Ala Cys Ser Asn Trp Thr Trp Ser Asn Val Val Val Thr Gly
 350 355 360

gga aag aag tac ggc agc tgc cag aat gtg ccg agt cct gct act tgt 1378
 Gly Lys Lys Tyr Gly Ser Cys Gln Asn Val Pro Ser Pro Ala Thr Cys
 365 370 375

taa 1381

<210> 2

< 211> 379

5

< 212> PRT

< 213> Endopoligalacturonasa de Trichoderma reesei (pga 1)

<400> 2

Met Leu Lys Leu Ser Leu Phe Leu Gly Ala Val Thr Ala Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Val Gln Ala His Ala Val Pro Pro Pro Thr Val Thr Gln Ala Pro Lys
 20 25 30

Leu Glu Asp Arg Ala Thr Thr Cys Thr Phe Ser Gly Ser Asn Gly Ala
 35 40 45

Ser Ser Ala Ser Lys Ser Gln Lys Ser Cys Ala Thr Ile Val Leu Ser
 50 55 60

Asn Val Ala Val Pro Ser Gly Val Thr Leu Asp Leu Ser Asp Leu Asn
 65 70 75 80

Asp Gly Thr Thr Val Ile Phe Glu Gly Thr Thr Thr Trp Gly Tyr Lys
 85 90 95

Glu Trp Ser Gly Pro Leu Leu Gln Ile Glu Gly Asn Asp Ile Thr Ile
 100 105 110

Gln Gly Ala Ser Gly Ala Val Leu Asn Pro Asp Gly Ala Arg Trp Trp
 115 120 125

Asp Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Lys Thr Lys Pro Lys Phe Phe Ala
 130 135 140

ES 2 564 083 T3

Ala His Asp Leu Thr Ser Ser Ser Ile Thr Asn Leu Tyr Ile Lys Asn
 145 150 155 160

Thr Pro Val Gln Ala Val Ser Val Asn Gly Val Asn Gly Leu Thr Ile
 165 170 175

Thr Gly Met Thr Ile Asp Asn Ser Ala Gly Asp Ser Gly Gly Gly His
 180 185 190

Asn Thr Asp Gly Phe Asp Ile Gly Ser Ser Ser Asn Val Val Ile Ser
 195 200 205

Gly Ala Lys Val Tyr Asn Gln Asp Asp Cys Val Ala Val Asn Ser Gly
 210 215 220

Thr Asn Ile Thr Phe Thr Gly Gly Leu Cys Ser Gly Gly His Gly Leu
 225 230 235 240

Ser Ile Gly Ser Val Gly Gly Arg Asp Asp Asn Thr Val Gln Thr Val
 245 250 255

Thr Phe Ser Asn Ser Gln Val Thr Lys Ser Ala Asn Gly Ile Arg Ile
 260 265 270

Lys Ala Thr Ala Gly Lys Thr Gly Thr Ile Lys Gly Val Thr Tyr Thr
 275 280 285

Gly Ile Thr Leu Ser Ser Ile Thr Gly Tyr Gly Ile Leu Ile Glu Gln
 290 295 300

Asn Tyr Asp Gly Gly Asp Leu His Gly Ser Pro Thr Ser Gly Ile Pro
 305 310 315 320

Ile Thr Asn Leu Val Leu Gln Asn Ile Ser Gly Ser Asn Gly Val Val
 325 330 335

Ser Ser Gly Asn Asn Ile Ala Ile Val Cys Gly Ser Gly Ala Cys Ser
 340 345 350

Asn Trp Thr Trp Ser Asn Val Val Val Thr Gly Gly Lys Lys Tyr Gly
 355 360 365

Ser Cys Gln Asn Val Pro Ser Pro Ala Thr Cys
 370 375

<210> 3

< 211> 1421

< 212> DNA

5 < 213> Exopoligalacturonasa de Trichoderma reesei (pgx 1)

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(576)

ES 2 564 083 T3

<220>

< 221> CDS

< 222> (627)..(1238)

<220>

5

< 221> CDS

< 222> (1296)..(1418)

<400> 3

atg	aca	att	ctc	agt	cgt	ctg	gca	gtc	ggc	gtg	gca	tta	ttg	gcc	ttt	48
Met	Thr	Ile	Leu	Ser	Arg	Leu	Ala	Val	Gly	Val	Ala	Leu	Leu	Ala	Phe	
1				5					10					15		
ccg	gaa	ctc	att	gat	gct	cac	aga	gtt	ccc	gtt	aag	aga	cca	aac	ctt	96
Pro	Glu	Leu	Ile	Asp	Ala	His	Arg	Val	Pro	Val	Lys	Arg	Pro	Asn	Leu	
			20					25					30			
caa	tgg	gga	ccc	aag	tcg	cca	gga	cat	gca	ttt	cct	cat	tct	cct	aaa	144
Gln	Trp	Gly	Pro	Lys	Ser	Pro	Gly	His	Ala	Phe	Pro	His	Ser	Pro	Lys	
		35					40					45				
cgc	cac	aag	aca	tgc	tat	gtt	ccg	agt	tgc	gga	agt	aac	gac	gca	cct	192
Arg	His	Lys	Thr	Cys	Tyr	Val	Pro	Ser	Cys	Gly	Ser	Asn	Asp	Ala	Pro	
						55					60					
gag	att	ctc	aaa	gct	ttc	aag	agg	tgc	aac	agg	gga	ggc	act	gtg	gtt	240
Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Phe	Lys	Arg	Cys	Asn	Arg	Gly	Gly	Thr	Val	Val	
65					70					75					80	
tta	aac	gag	gag	tat	gtg	att	gcc	tct	cct	ctc	gat	ctc	aca	ttc	ctg	288
Leu	Asn	Glu	Glu	Tyr	Val	Ile	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Leu	Thr	Phe	Leu	
				85					90					95		
gag	tct	gta	gat	gtg	gcc	atc	aca	ggc	acc	atc	aaa	ttc	acg	aac	gac	336
Glu	Ser	Val	Asp	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Thr	Ile	Lys	Phe	Thr	Asn	Asp	
			100					105					110			
atc	gac	ttt	tgg	gtg	gtg	aac	tca	ttc	aag	tac	gac	ttc	caa	aac	tcc	384
Ile	Asp	Phe	Trp	Val	Val	Asn	Ser	Phe	Lys	Tyr	Asp	Phe	Gln	Asn	Ser	
		115					120					125				
tct	gcc	ttc	tgg	cgc	ttt	gga	gga	aaa	gat	gtc	aat	atc	tac	ggt	ggg	432
Ser	Ala	Phe	Trp	Arg	Phe	Gly	Gly	Lys	Asp	Val	Asn	Ile	Tyr	Gly	Gly	
		130			135						140					
gga	cac	ggt	ttg	att	gat	gga	aat	ggc	caa	gcc	tgg	tat	gat	cga	ttt	480
Gly	His	Gly	Leu	Ile	Asp	Gly	Asn	Gly	Gln	Ala	Trp	Tyr	Asp	Arg	Phe	
145					150					155					160	
gca	gtc	gag	cct	act	cta	ctg	cgt	ccc	att	ctt	ctt	gtc	ctg	gat	gga	528
Ala	Val	Glu	Pro	Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Asp	Gly	
				165					170					175		
ctt	gat	cgt	gga	tca	gtc	aca	gga	ttg	aag	atg	cga	aat	tcg	ccc	gat	576
Leu	Asp	Arg	Gly	Ser	Val	Thr	Gly	Leu	Lys	Met	Arg	Asn	Ser	Pro	Asp	
			180					185					190			
gcagg	tatct	cttcgc	cttat	tc	atct	ggaa	tcg	ttg	ctaa	tgtg	gttcag	tg	ttt			632
													Trp	Phe		
aat	ctc	att	gcc	aat	agc	agt	gac	att	ctg	gtc	agc	gat	atc	gac	atc	680
Asn	Leu	Ile	Ala	Asn	Ser	Ser	Asp	Ile	Leu	Val	Ser	Asp	Ile	Asp	Ile	
195					200					205					210	

ES 2 564 083 T3

gca gtc aag agt gag agc aag aat ccg gcc aag aat ggc gat gga tgg 728
Ala Val Lys Ser Glu Ser Lys Asn Pro Ala Lys Asn Gly Asp Gly Trp
215 220 225

gac act ttt cga agc gat tca gtc gtt ata caa gat tcc tac gtg aat 776
Asp Thr Phe Arg Ser Asp Ser Val Val Ile Gln Asp Ser Tyr Val Asn
230 235 240

aac agc gat gat tgc gta tct ttc aag ccg aac agc acc aac atc atc 824
Asn Ser Asp Asp Cys Val Ser Phe Lys Pro Asn Ser Thr Asn Ile Ile
245 250 255

gtg cag ggc atg cag tgc aac ggc tct cac ggg atc tca gtc ggc tct 872
Val Gln Gly Met Gln Cys Asn Gly Ser His Gly Ile Ser Val Gly Ser
260 265 270

ctg ggc cag tat ccg gca gag tat gat atc gtc gaa cac gta tat gtc 920
Leu Gly Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Asp Ile Val Glu His Val Tyr Val
275 280 285 290

tac aat atc tcg atg tcc aac gcc agc gac gga gct cgt atc aaa gtg 968
Tyr Asn Ile Ser Met Ser Asn Ala Ser Asp Gly Ala Arg Ile Lys Val
295 300 305

tgg cct ggc act gat act cct ttt gaa ccc ggt ctc tct gga ggt gga 1016
Trp Pro Gly Thr Asp Thr Pro Phe Glu Pro Gly Leu Ser Gly Gly Gly
310 315 320

ggg gcc gga tac gtc aag aac gtc act tac gac acc ttt cac aac aat 1064
Gly Ala Gly Tyr Val Lys Asn Val Thr Tyr Asp Thr Phe His Asn Asn
325 330 335

aac aat gac tgg gct att gag atc aat caa tgc tat ggc cag agt aac 1112
Asn Asn Asp Trp Ala Ile Glu Ile Asn Gln Cys Tyr Gly Gln Ser Asn
340 345 350

cag acg atc tgc gac aag tat cct tcc aat atg acc atc agc gat gtc 1160
Gln Thr Ile Cys Asp Lys Tyr Pro Ser Asn Met Thr Ile Ser Asp Val
355 360 365 370

gta ttc aaa aac atg tgg gga aca act tcg aag aag tat gac cct aaa 1208
Val Phe Lys Asn Met Trp Gly Thr Thr Ser Lys Lys Tyr Asp Pro Lys
375 380 385

gtt ggg acc ctg aca tgc tcg tct acg gag gtgagtcgaa tcgtgagagg 1258
Val Gly Thr Leu Thr Cys Ser Ser Thr Glu
390 395

cacttgact actacaacct gacacagagt tcttttag aaa agc gtg aat atc gcg 1313
Lys Ser Val Asn Ile Ala
400

gcg aag aac atc tcg gtg gtt aat ccg agt ggc agg att cct cag tgg 1361
Ala Lys Asn Ile Ser Val Val Asn Pro Ser Gly Arg Ile Pro Gln Trp
405 410 415

att tgc acc aat atg gac gaa agc ctg cta gac ata gat tgt gtc ccg 1409
Ile Cys Thr Asn Met Asp Glu Ser Leu Leu Asp Ile Asp Cys Val Pro
420 425 430

gct acg tcg taa 1421
Ala Thr Ser
435

<210> 4

<211> 437

<212> PRT

5 <213> Exopoligalacturonasa de *Trichoderma reesei* (pgx 1)

<400> 4

ES 2 564 083 T3

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

ES 2 564 083 T3

Val Asn Asn Ser Asp Asp Cys Val Ser Phe Lys Pro Asn Ser Thr Asn
 245 250 255
 Ile Ile Val Gln Gly Met Gln Cys Asn Gly Ser His Gly Ile Ser Val
 260 265 270
 Gly Ser Leu Gly Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Asp Ile Val Glu His Val
 275 280 285
 Tyr Val Tyr Asn Ile Ser Met Ser Asn Ala Ser Asp Gly Ala Arg Ile
 290 295 300
 Lys Val Trp Pro Gly Thr Asp Thr Pro Phe Glu Pro Gly Leu Ser Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Ala Gly Tyr Val Lys Asn Val Thr Tyr Asp Thr Phe His
 325 330 335
 Asn Asn Asn Asn Asp Trp Ala Ile Glu Ile Asn Gln Cys Tyr Gly Gln
 340 345 350
 Ser Asn Gln Thr Ile Cys Asp Lys Tyr Pro Ser Asn Met Thr Ile Ser
 355 360 365
 Asp Val Val Phe Lys Asn Met Trp Gly Thr Thr Ser Lys Lys Tyr Asp
 370 375 380
 Pro Lys Val Gly Thr Leu Thr Cys Ser Ser Thr Glu Lys Ser Val Asn
 385 390 395 400
 Ile Ala Ala Lys Asn Ile Ser Val Val Asn Pro Ser Gly Arg Ile Pro
 405 410 415
 Gln Trp Ile Cys Thr Asn Met Asp Glu Ser Leu Leu Asp Ile Asp Cys
 420 425 430
 Val Pro Ala Thr Ser
 435

<210> 5

<211> 1374

<212> DNA

5 <213> Exorramnogalacturonasa de *Trichoderma reesei* (rgx 1)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1374)

<400> 5

atg gtg gcg cta tcg tcc atc att ctg gcg gca ttg ccc atc gct ctc
 Met Val Ala Leu Ser Ser Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ile Ala Leu
 1 5 10 15

48

10

ES 2 564 083 T3

gca	gtg	tca	tct	tcg	gcc	cct	gat	ctc	atg	ggc	agg	gag	gca	aat	gct	96
Ala	Val	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Asp	Leu	Met	Gly	Arg	Glu	Ala	Asn	Ala	
			20					25					30			
gct	cag	acg	gaa	tcc	cat	tgg	gca	aac	cac	gcg	gcg	gct	caa	ggt	cgc	144
Ala	Gln	Thr	Glu	Ser	His	Trp	Ala	Asn	His	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Arg	
		35					40					45				
cat	ttc	tgc	tat	gtt	cga	cct	gat	gcc	gac	ggc	ggt	gat	gat	gca	ccg	192
His	Phe	Cys	Tyr	Val	Arg	Pro	Asp	Ala	Asp	Gly	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	
	50					55					60					
gcc	ata	atg	gat	gct	ctc	aac	aac	aaa	tgc	aac	tca	agg	agc	ctt	gtc	240
Ala	Ile	Met	Asp	Ala	Leu	Asn	Asn	Lys	Cys	Asn	Ser	Arg	Ser	Leu	Val	
65					70				75					80		
atc	ttc	cct	ggg	ccc	gtg	tac	aac	atc	cag	aca	aac	atg	acg	acc	ttg	288
Ile	Phe	Pro	Gly	Pro	Val	Tyr	Asn	Ile	Gln	Thr	Asn	Met	Thr	Thr	Leu	
				85					90					95		
aac	ctg	gaa	gat	gtt	gtc	att	tat	caa	ttt	ggg	cgc	atg	ctc	tgg	agc	336
Asn	Leu	Glu	Asp	Val	Val	Ile	Tyr	Gln	Phe	Gly	Arg	Met	Leu	Trp	Ser	
			100					105					110			
acg	gac	att	gac	tac	tgg	ctt	tca	gta	tct	atg	ccc	gtt	ggc	ttc	cag	384
Thr	Asp	Ile	Asp	Tyr	Trp	Leu	Ser	Val	Ser	Met	Pro	Val	Gly	Phe	Gln	
		115					120					125				
aat	cag	agt	acg	gtc	tgg	tac	ttt	ggg	ggc	aac	aat	gtc	atc	tgg	gac	432
Asn	Gln	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	Phe	Gly	Gly	Asn	Asn	Val	Ile	Trp	Asp	
	130				135						140					
ggt	tgg	ggt	ggt	ggt	acg	ctt	gat	ggc	aac	ggt	caa	gtc	tgg	tat	gac	480
Gly	Trp	Gly	Val	Gly	Thr	Leu	Asp	Gly	Asn	Gly	Gln	Val	Trp	Tyr	Asp	
145				150					155					160		
tgg	gct	agg	agt	caa	gga	aac	ctg	cct	cac	cg	ccg	atg	aac	atc	aac	528
Trp	Ala	Arg	Ser	Gln	Gly	Asn	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Met	Asn	Ile	Asn	
				165					170					175		
ttg	cg	acc	ctc	acc	aac	tcc	gtc	atc	cg	cg	atg	cg	ttc	gtc	caa	576
Leu	Arg	Thr	Leu	Thr	Asn	Ser	Val	Ile	Arg	Arg	Met	Arg	Phe	Val	Gln	
			180					185					190			
agc	cag	atg	tgg	aca	atg	gcc	att	acg	tac	tcc	cag	cat	ggt	gag	ctg	624
Ser	Gln	Met	Trp	Thr	Met	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ser	Gln	His	Val	Glu	Leu	
		195					200					205				
gat	gac	att	tat	gtc	aac	agt	act	tcg	aca	agc	cag	tgg	agc	acg	ctg	672
Asp	Asp	Ile	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Gln	Trp	Ser	Thr	Leu	
	210					215					220					
aac	acg	gac	ggt	tgc	gac	act	atc	ttt	tca	gat	agc	atc	act	ttc	aga	720
Asn	Thr	Asp	Gly	Cys	Asp	Thr	Ile	Phe	Ser	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Arg	
225				230					235					240		
aga	tgg	acc	gtc	tcc	aac	ggc	gac	gat	gcc	atc	gcc	ctc	aag	atg	aac	768
Arg	Trp	Thr	Val	Ser	Asn	Gly	Asp	Asp	Ala	Ile	Ala	Leu	Lys	Met	Asn	
				245					250				255			
tcg	agt	aac	att	gct	gtg	tat	gac	agc	tat	ttc	gag	aat	gga	cag	ggc	816
Ser	Ser	Asn	Ile	Ala	Val	Tyr	Asp	Ser	Ser	Tyr	Phe	Glu	Asn	Gly	Gln	
			260					265					270			

ES 2 564 083 T3

ata gcc atc ggg tcc atg gga caa tac aac ggc cga tac gag tat ctg 864
 Ile Ala Ile Gly Ser Met Gly Gln Tyr Asn Gly Arg Tyr Glu Tyr Leu
 275 280 285

gaa aac ttt tat gcg aaa aac att act ctc aag aat act gct cat gtc 912
 Glu Asn Phe Tyr Ala Lys Asn Ile Thr Leu Lys Asn Thr Ala His Val
 290 295 300

tcc tac ctc aag aca tgg gct ggc atc tca aga ggg tac ccc ccc aac 960
 Ser Tyr Leu Lys Thr Trp Ala Gly Ile Ser Arg Gly Tyr Pro Pro Asn
 305 310 315 320

ggt gga ggt ggc ggt tac ggg gtc gcc cga aac att acc atc gag gac 1008
 Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Val Ala Arg Asn Ile Thr Ile Trp Glu Asp
 325 330 335

gtc aaa ctc att ggc gga cga cag caa ccc ttc ttc gcc tgg cag tgc 1056
 Val Lys Leu Ile Gly Gly Arg Gln Gln Pro Phe Phe Ala Trp Gln Cys
 340 345 350

gaa aac tac tcc gga tac gcc ggc caa gac tgc gac tct tcc ctg ttc 1104
 Glu Asn Tyr Ser Gly Tyr Ala Gly Gln Asp Cys Asp Ser Ser Leu Phe
 355 360 365

aag atg gaa gat gtt gcg tgg agg cgg gtc agc gga aca gtg caa tct 1152
 Lys Met Glu Asp Val Ala Trp Arg Arg Val Ser Gly Thr Val Gln Ser
 370 375 380

gga gtg acg gag gcg gcc tat ttc caa tgc agc gcc gcg gct gga gga 1200
 Gly Val Thr Glu Ala Ala Tyr Phe Gln Cys Ser Ala Ala Ala Gly Gly
 385 390 395 400

tgc gat gac ttt gag gtg acg ggc ttt gat gtt acc aag gag ggc act 1248
 Cys Asp Asp Phe Glu Val Thr Gly Phe Asp Val Thr Lys Glu Gly Thr
 405 410 415

gac gaa ctt ctg gct ata tgg gac tgc ttc aac gta aac aat ccc gta 1296
 Asp Glu Leu Leu Ala Ile Trp Asp Cys Phe Asn Val Asn Asn Pro Val
 420 425 430

ggc ttt acc tgt acc gag tca caa gcc cag aaa atg agc tca gac gtg 1344
 Gly Phe Thr Cys Thr Glu Ser Gln Ala Gln Lys Met Ser Ser Asp Val
 435 440 445

acc ggc ggc cat ggc tcc aac aac aag tag 1374
 Thr Gly Gly His Gly Ser Asn Asn Lys
 450 455

<210> 6

< 211> 457

< 212> PRT

5 < 213> Exorramnogalacturonasa de *Trichoderma reesei* (rgx 1)

<400> 6

Met Val Ala Leu Ser Ser Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ile Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Val Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Gly Arg Glu Ala Asn Ala
 20 25 30

Ala Gln Thr Glu Ser His Trp Ala Asn His Ala Ala Ala Gln Gly Arg
 35 40 45

ES 2 564 083 T3

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

ES 2 564 083 T3

Ser Tyr Leu Lys Thr Trp Ala Gly Ile Ser Arg Gly Tyr Pro Pro Asn
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Val Ala Arg Asn Ile Thr Ile Glu Asp
 325 330 335
 Val Lys Leu Ile Gly Gly Arg Gln Gln Pro Phe Phe Ala Trp Gln Cys
 340 345 350
 Glu Asn Tyr Ser Gly Tyr Ala Gly Gln Asp Cys Asp Ser Ser Leu Phe
 355 360 365
 Lys Met Glu Asp Val Ala Trp Arg Arg Val Ser Gly Thr Val Gln Ser
 370 375 380
 Gly Val Thr Glu Ala Ala Tyr Phe Gln Cys Ser Ala Ala Ala Gly Gly
 385 390 395 400
 Cys Asp Asp Phe Glu Val Thr Gly Phe Asp Val Thr Lys Glu Gly Thr
 405 410 415
 Asp Glu Leu Leu Ala Ile Trp Asp Cys Phe Asn Val Asn Asn Pro Val
 420 425 430
 Gly Phe Thr Cys Thr Glu Ser Gln Ala Gln Lys Met Ser Ser Asp Val
 435 440 445
 Thr Gly Gly His Gly Ser Asn Asn Lys
 450 455

<210> 7

<211> 1218

<212> DNA

5 <213> Xilogalacturonasa de *Trichoderma reesei* (xga 1)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1218)

<400> 7

atg ctc ctt ggc ggg tgt ctt gtt ctt gtg gcc gtg gtg gcc aac gtc	48
Met Leu Leu Gly Gly Cys Leu Val Leu Val Ala Val Val Ala Asn Val	
1 5 10 15	
gct gcg gtg aat ttg ctg caa cct ccg acc aag gtc atc aag aga gcc	96
Ala Ala Val Asn Leu Leu Gln Pro Thr Lys Val Ile Lys Arg Ala	
20 25 30	
tcg acg tgt acg cca gta gcg ggg cgt tca agt gcg aca gat gat aca	144
Ser Thr Cys Thr Pro Val Ala Gly Arg Ser Ser Ala Thr Asp Asp Thr	
35 40 45	
ctc gcg att caa tcc gcg atc gcc agt tgc tcc tct ggg act att gtt	192
Leu Ala Ile Gln Ser Ala Ile Ala Ser Cys Ser Ser Gly Thr Ile Val	
50 55 60	

10

ES 2 564 083 T3

atc Ile 65	cct Pro	gcg Ala	tct Ser	acg Thr	act Thr 70	tac Tyr	cac His	atc Ile	aat Asn 75	acg Thr 75	gcc Ala	ctg Leu	agc Ser	ttc Phe 80	aaa Lys	240
ggc Gly	tgc Cys	tct Ser	gga Gly	tgc Cys 85	acg Thr	ttg Leu	caa Gln	atc Ile	gaa Glu 90	ggc Gly	act Thr	cta Leu	caa Gln	gcc Ala 95	ata Ile	288
tcc Ser	gac Asp	acc Thr	aac Asn 100	tac Tyr	tgg Trp	gaa Glu	ggt Gly	tta Leu 105	cga Arg	gcc Ala	atc Ile	ttt Phe	ctc Leu 110	atg Met	gat Asp	336
ggc Gly	atc Ile	aac Asn 115	ggc Gly	gcg Ala	aac Asn	ata Ile	tat Tyr 120	tca Ser	aat Asn	acg Thr	ggc Gly	aaa Lys 125	ggc Gly	gtc Val	atc Ile	384
gat Asp	gga Gly 130	aac Asn	ggc Gly	caa Gln	gct Ala	gcg Ala 135	tgg Trp	gac Asp	gtc Val	ttt Phe	gca Ala 140	gcc Ala	aat Asn	tct Ser	tcg Ser	432
tat Tyr 145	aga Arg	cga Arg	ccg Pro	acg Thr	ctc Leu 150	ttc Phe	tac Tyr	atc Ile	aac Asn	aat Asn 155	tcc Ser	aag Lys	aac Asn	gtc Val	aac Asn 160	480
gtc Val	cgt Arg	aac Asn	ctc Leu	tac Tyr 165	ttc Phe	aag Lys	agt Ser	gct Ala	cca Pro 170	aat Asn	gtc Val	ttt Phe	cac His	tcg Ser 175	gtg Val	528
acc Thr	ggc Gly	ggc Gly	tcc Ser 180	agc Ser	aat Asn	gtc Val	act Thr	tac Tyr 185	acc Thr	gac Asp	atc Ile	act Thr	ctc Leu 190	tac Tyr	gcc Ala	576
gtg Val	agc Ser	aac Asn 195	agc Ser	tcc Ser	aat Asn	ggt Val	gcg Ala 200	cac His	aac Asn	act Thr	gac Asp	ggc Gly 205	tgg Trp	gac Asp	atc Ile	624
gga Gly 210	cag Gln	tca Ser	acc Thr	tac Tyr	gtg Val	agc Ser 215	atc Ile	aat Asn	cac His	gcc Ala	aca Thr 220	gtc Val	aca Thr	aac Asn	gac Asp	672
gat Asp 225	gac Asp	tgc Cys	ggt Val	gct Ala	ttc Phe 230	aag Lys	cca Pro	ggc Gly	agc Ser	agc Ser 235	ttc Phe	gcg Ala	acc Thr	gtt Val	acc Thr 240	720
aac Asn	atc Ile	acc Thr	tgc Cys 245	aca Thr	ggt Gly	agc Ser	cac His	ggt Gly	atc Ile 250	tcc Ser	gtc Val	gga Gly	agc Ser	ttg Leu 255	ggc Gly	768
agc Ser	ggt Gly	gcc Ala	gga Gly 260	aat Asn	aca Thr	gac Asp	acg Thr	ggt Val 265	cag Gln	aat Asn	tgt Cys	ttc Phe	gtg Val 270	agc Ser	gga Gly	816
gcg Ala	acc Thr	atg Met 275	att Ile	gac Asp	tct Ser	acc Thr	aag Lys 280	gct Ala	gca Ala	ggt Gly	ctc Leu	aag Lys 285	ctt Leu	tac Tyr	ccg Pro	864
ggc Gly 290	ccc Pro	ccg Lys	aaa Lys	cat His	ggc Gly 295	aca Thr 295	gct Ala	atc Ile	gtg Val	acc Thr	aat Asn 300	gtg Val	act Thr	ttt Phe	gag Glu	912
aac Asn 305	ttt Phe	gtg Val	ttg Leu	aag Lys	aac Asn 310	acc Thr	gac Asp	tac Tyr	gct Ala	ttc Phe 315	caa Gln	ggt Val	caa Gln	agc Ser	tgc Cys 320	960
tac Tyr	ggc Gly	gaa Glu	gat Asp	gca Ala 325	tcg Ser	tat Tyr	tgc Cys	agc Ser	agc Ser 330	agc Ser	ccg Pro	agc Ser	acc Thr	gcg Ala 335	caa Gln	1008

ES 2 564 083 T3

gtc aaa ggc gtg gtg gtg cgg aac ttt tcg ggg acg aca agc agc cat 1056
Val Lys Gly Val Val Val Arg Asn Phe Ser Gly Thr Thr Ser Ser His
340 345 350

tat tcg ccg aat gtt gca aac ctc aac tgc cca gct gct ggg tcg tgc 1104
Tyr Ser Pro Asn Val Ala Asn Leu Asn Cys Pro Ala Ala Gly Ser Cys
355 360 365

ggc ctc acc ttg agc aac atc acg gtg aag ccg ccg agc ggc tca gcc 1152
Gly Leu Thr Leu Ser Asn Ile Thr Val Lys Pro Pro Ser Gly Ser Ala
370 375 380

gtg ttt caa tgt gca aac acg ccc agt agc atc ggg gtg ccg tgc tct 1200
Val Phe Gln Cys Ala Asn Thr Pro Ser Ser Ile Gly Val Pro Cys Ser
385 390 395 400

gct ggc gcc agc gga taa 1218
Ala Gly Ala Ser Gly
405

<210> 8

< 211> 405

< 212> PRT

5 < 213> Xilogalacturonasa de *Trichoderma reesei* (xga 1)

<400> 8

Met Leu Leu Gly Gly Cys Leu Val Leu Val Ala Val Val Ala Asn Val
1 5 10 15

Ala Ala Val Asn Leu Leu Gln Pro Pro Thr Lys Val Ile Lys Arg Ala
20 25 30

Ser Thr Cys Thr Pro Val Ala Gly Arg Ser Ser Ala Thr Asp Asp Thr
35 40 45

Leu Ala Ile Gln Ser Ala Ile Ala Ser Cys Ser Ser Gly Thr Ile Val
50 55 60

Ile Pro Ala Ser Thr Thr Tyr His Ile Asn Thr Ala Leu Ser Phe Lys
65 70 75 80

Gly Cys Ser Gly Cys Thr Leu Gln Ile Glu Gly Thr Leu Gln Ala Ile
85 90 95

Ser Asp Thr Asn Tyr Trp Glu Gly Leu Arg Ala Ile Phe Leu Met Asp
100 105 110

Gly Ile Asn Gly Ala Asn Ile Tyr Ser Asn Thr Gly Lys Gly Val Ile
115 120 125

Asp Gly Asn Gly Gln Ala Ala Trp Asp Val Phe Ala Ala Asn Ser Ser
130 135 140

Tyr Arg Arg Pro Thr Leu Phe Tyr Ile Asn Asn Ser Lys Asn Val Asn
145 150 155 160

ES 2 564 083 T3

Val Arg Asn Leu Tyr Phe Lys Ser Ala Pro Asn Val Phe His Ser Val
 165 170 175

Thr Gly Gly Ser Ser Asn Val Thr Tyr Thr Asp Ile Thr Leu Tyr Ala
 180 185 190

Val Ser Asn Ser Ser Asn Val Ala His Asn Thr Asp Gly Trp Asp Ile
 195 200 205

Gly Gln Ser Thr Tyr Val Ser Ile Asn His Ala Thr Val Thr Asn Asp
 210 215 220

Asp Asp Cys Val Ala Phe Lys Pro Gly Ser Ser Phe Ala Thr Val Thr
 225 230 235 240

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Ser His Gly Ile Ser Val Gly Ser Leu Gly
 245 250 255

Ser Gly Ala Gly Asn Thr Asp Thr Val Gln Asn Cys Phe Val Ser Gly
 260 265 270

Ala Thr Met Ile Asp Ser Thr Lys Ala Ala Gly Leu Lys Leu Tyr Pro
 275 280 285

Gly Pro Pro Lys His Gly Thr Ala Ile Val Thr Asn Val Thr Phe Glu
 290 295 300

Asn Phe Val Leu Lys Asn Thr Asp Tyr Ala Phe Gln Val Gln Ser Cys
 305 310 315 320

Tyr Gly Glu Asp Ala Ser Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Ser Thr Ala Gln
 325 330 335

Val Lys Gly Val Val Val Arg Asn Phe Ser Gly Thr Thr Ser Ser His
 340 345 350

Tyr Ser Pro Asn Val Ala Asn Leu Asn Cys Pro Ala Ala Gly Ser Cys
 355 360 365

Gly Leu Thr Leu Ser Asn Ile Thr Val Lys Pro Pro Ser Gly Ser Ala
 370 375 380

Val Phe Gln Cys Ala Asn Thr Pro Ser Ser Ile Gly Val Pro Cys Ser
 385 390 395 400

Ala Gly Ala Ser Gly
 405

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 9
 gatcccgcgg caacatgctc aagctatcac 30
 <210> 10
 < 211> 30
 5 < 212> DNA
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 10
 10 gatcctcgag cattcttcac ggcattctac 30
 <210> 11
 < 211> 27
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia artificial
 15 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 11
 cagtccgcgg ctaagcaaag gagcacg 27
 <210> 12
 20 < 211> 31
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 25 <400> 12
 cgtaggatcc gtagtagagt tcattgcat c 31
 <210> 13
 < 211> 31

< 212> DNA
< 213> Secuencia artificial
<220>
< 223> Cebador
5 <400> 13
gactccgagg cgactccat catgctcctt g 31
<210> 14
< 211> 21
< 212> DNA
10 < 213> Secuencia artificial
<220>
< 223> Cebador
<400> 14
gatcaccgag gatgctttat g 21
15 <210> 15
< 211> 32
< 212> DNA
< 213> Secuencia artificial
<220>
20 < 223> Cebador
<400> 15
gtaccgagg tcgacagaat ggtggcgcta tc 32
<210> 16
< 211> 31
25 < 212> DNA
< 213> Secuencia artificial
<220>
< 223> Cebador

<400> 16

gtcaggatcc agagcggat caagcagtat c 31

REIVINDICACIONES

1. Uso de una o más enzimas pectinolíticas para el tratamiento de pulpa de frutas u hortalizas, en el que al menos una enzima pectinolítica es un polipéptido que tiene actividad pectinolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
- 5 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad y aún más preferiblemente al menos 98% de identidad con la secuencia del polipéptido de PGAI según la SEQ ID NO:2 y
- b) un fragmento de a) que tiene actividad pectinolítica.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que la enzima pectinolítica es la poligalacturonasa que tiene la secuencia de aminoácidos de 22-379 de la SEQ ID NO:2.
3. El uso según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la fruta o la hortaliza se selecciona de manzanas, peras, uvas, bayas, zanahorias o tomates.
4. El uso según la reivindicación 3, en el que la fruta es manzana.
- 15 5. El uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima pectinolítica es una poligalacturonasa de *Trichoderma reesei* que tiene la secuencia de aminoácidos de 22-379 de la SEQ ID NO: 2 y la fruta es manzana.
6. Procedimiento para el tratamiento enzimático de pulpa de frutas u hortalizas que comprende la etapa de añadir una o más enzimas pectinolíticas, en el que al menos una enzima pectinolítica es un polipéptido que tiene actividad pectinolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
- 20 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad y aún más preferiblemente al menos 98% de identidad con la secuencia del polipéptido de PGAI según la SEQ ID NO:2
- y
- 25 b) un fragmento de a) que tiene actividad pectinolítica.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que la enzima pectinolítica es la poligalacturonasa que tiene la secuencia de aminoácidos de 22-379 de la SEQ ID NO: 2.
8. El procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 7, en el que la fruta u hortaliza se selecciona de manzanas, peras, uvas, bayas, zanahorias o tomates.
- 30 9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que la fruta es manzana.
10. El procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la enzima pectinolítica es una poligalacturonasa de *Trichoderma reesei* que tiene la secuencia de aminoácidos de 22-379 de SEQ ID NO: 2 y la fruta es manzana.
11. Un procedimiento para la preparación de un zumo de frutas u hortalizas que comprende un procedimiento para el tratamiento enzimático de pulpa de frutas u hortalizas según una de las reivindicaciones 6 a 10.
- 35 12. Molécula de DNA recombinante, que al expresarse en una célula anfitriona procariótica o eucariótica codifica un polipéptido que tiene actividad de endopoligalacturonasa, comprendiendo la molécula de DNA recombinante una secuencia de DNA seleccionada de
- a) secuencias de DNA que tienen o comprenden la SEQ ID NO: 1 (pga 1),
- 40 b) secuencias de DNA que tienen un grado de identidad de 85% a 98% con las secuencias de a), o
- c) secuencias de DNA que están relacionadas con las secuencias de a) o b) debido a la degeneración del código genético.
13. Polipéptido que tiene actividad de endopoligalacturonasa y que es codificado por una molécula de DNA recombinante según la reivindicación 12.
- 45 14. Vector que tiene la capacidad de transformar una célula anfitriona que comprende al menos una molécula de DNA recombinante según la reivindicación 12.

15. Célula anfitriona transformada seleccionada de una célula fúngica, de levadura, bacteriana o de mamífero que comprende al menos una molécula de DNA recombinante según la reivindicación 12 y que tiene la capacidad de expresar un polipéptido que tiene la actividad respectiva.
- 5 16. Célula anfitriona transformada según la reivindicación 15 perteneciente a la categoría de *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Hypocrea*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Neurospora*, *Mucor*, *Penicillium*, *Saccharomyces* o *Fusarium*.
17. Preparación que comprende uno o más polipéptidos según la reivindicación 13, opcionalmente junto con enzimas y/o excipientes adicionales.

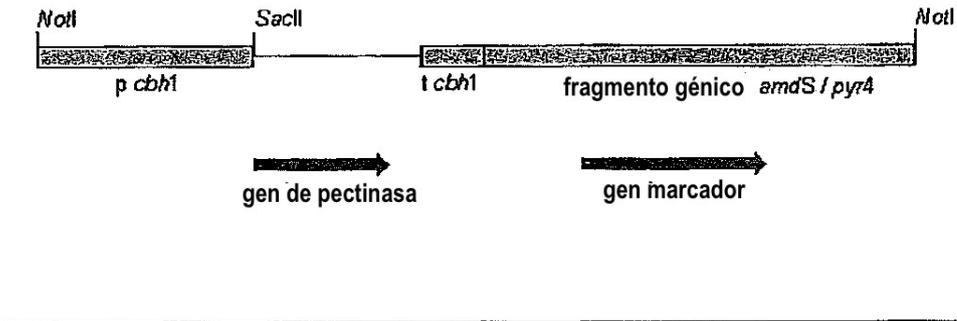
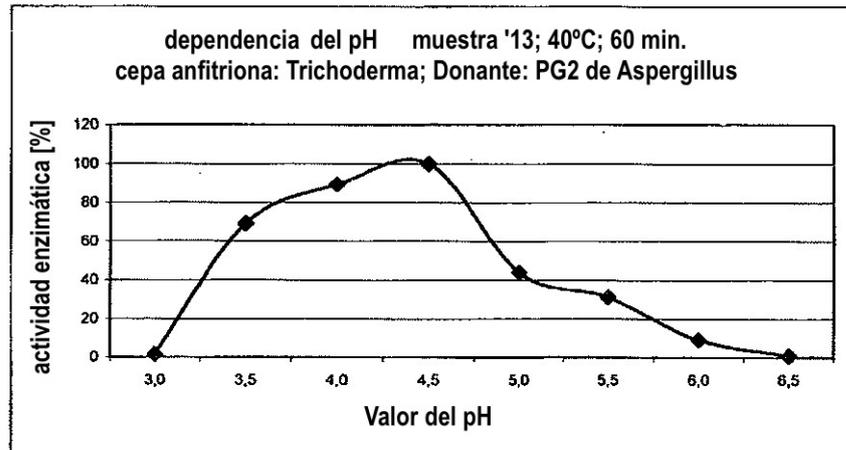
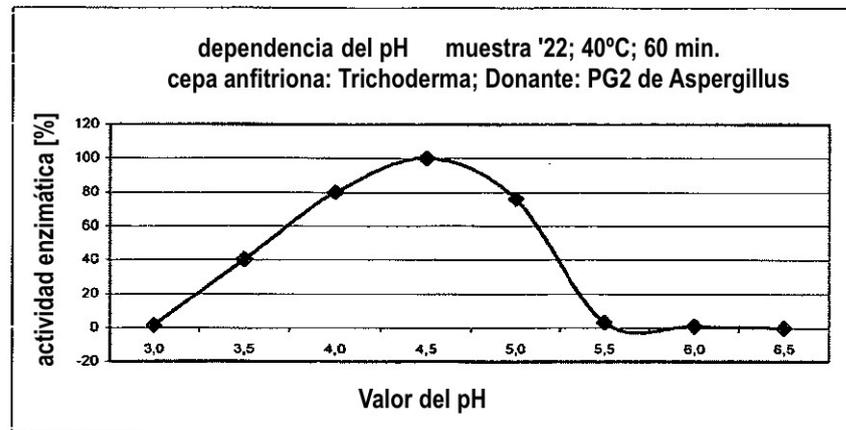


Figura 1

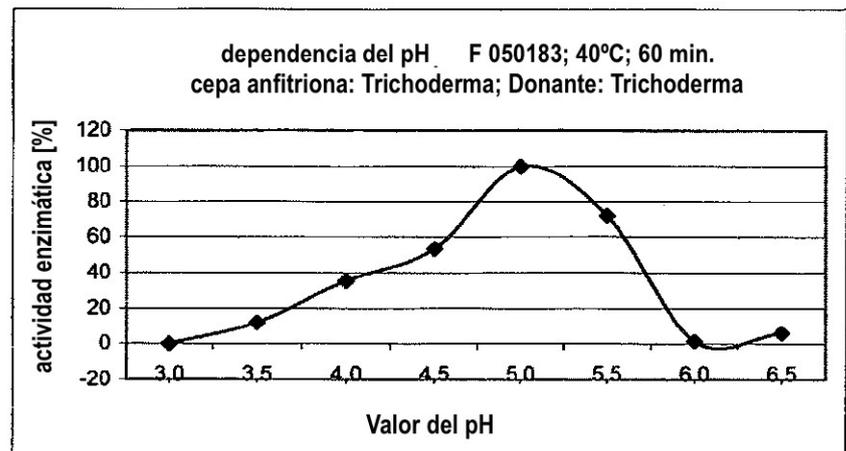
2A



2B

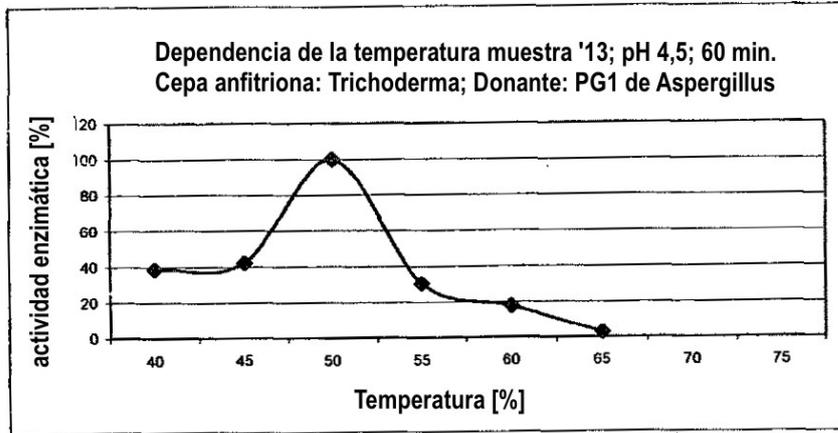


2C

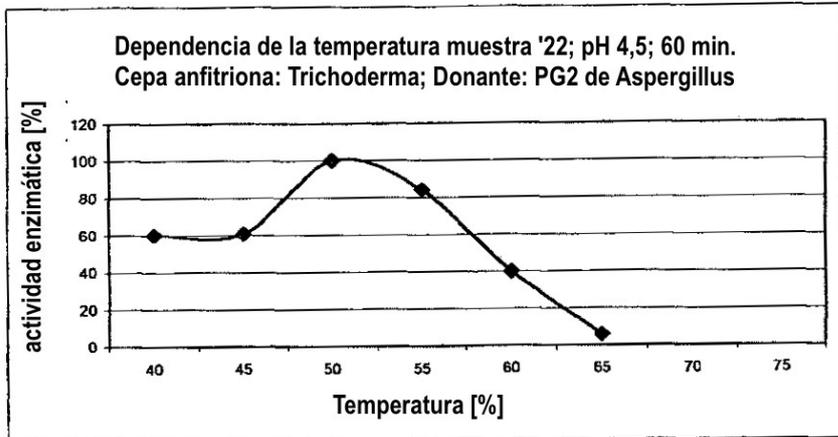


Figuras 2A-C

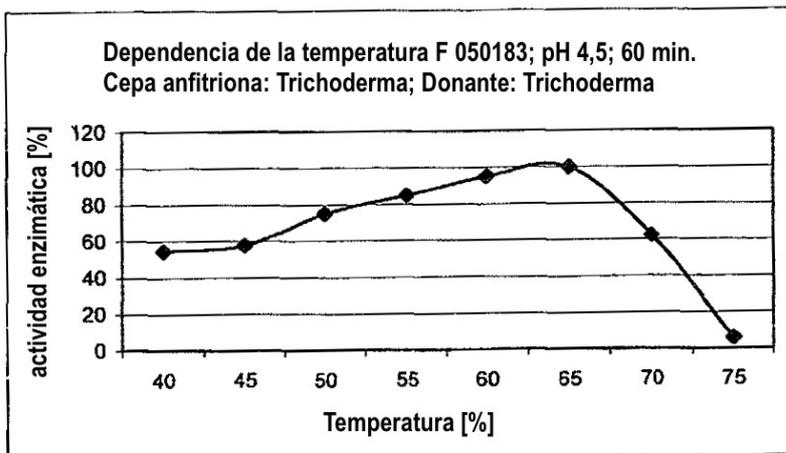
2D



2E



2F



Figuras 2D-F

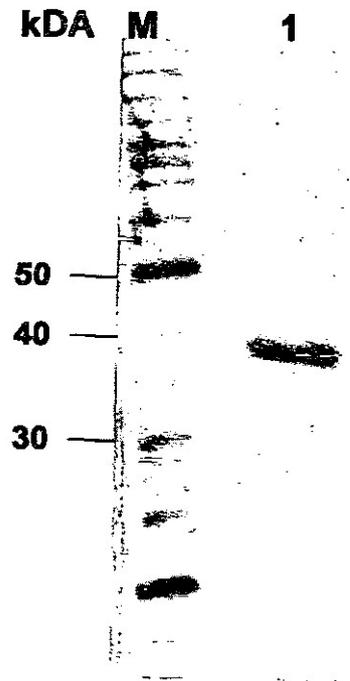


Figura 3

Fig. 4A

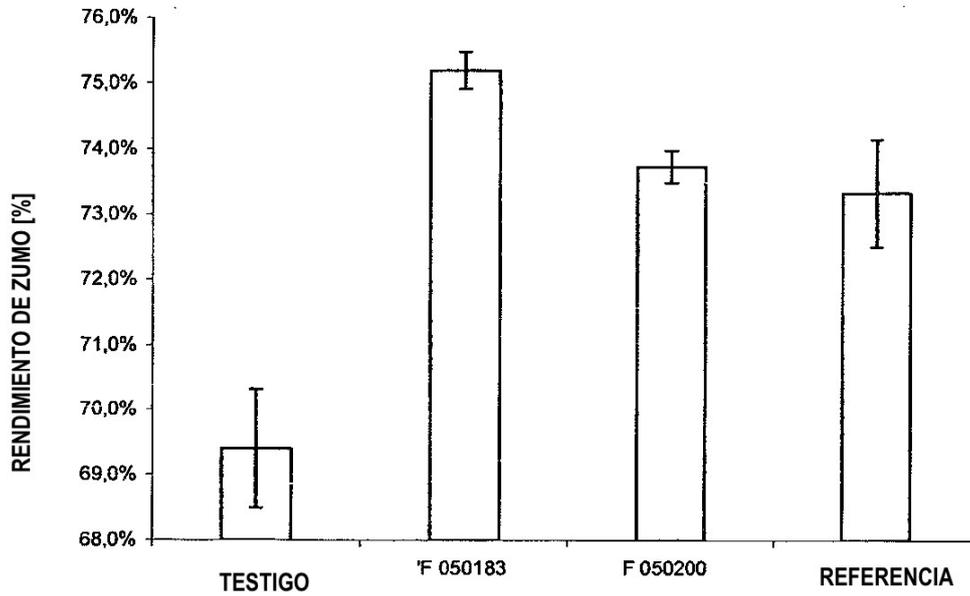
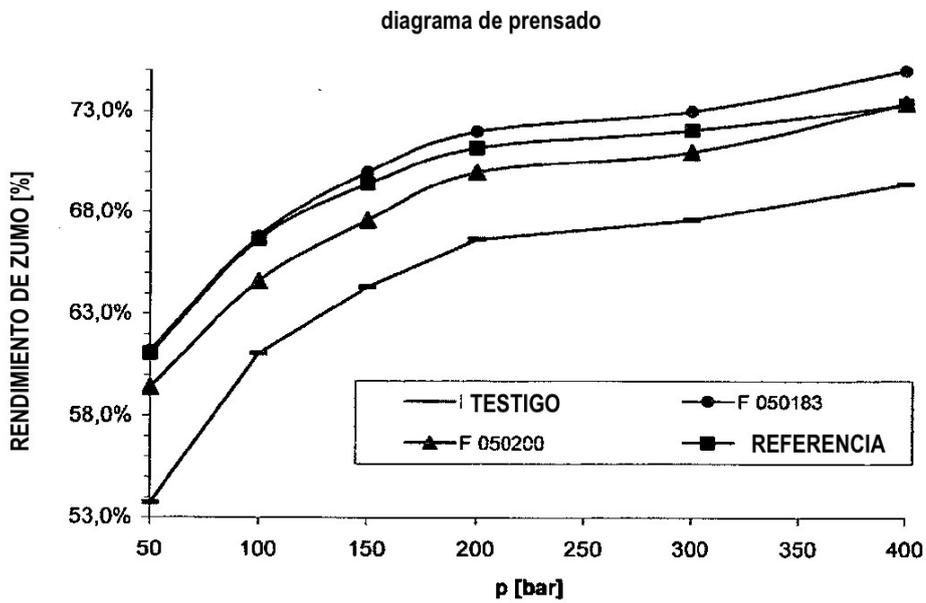


Fig. 4B



Figuras 4A + B

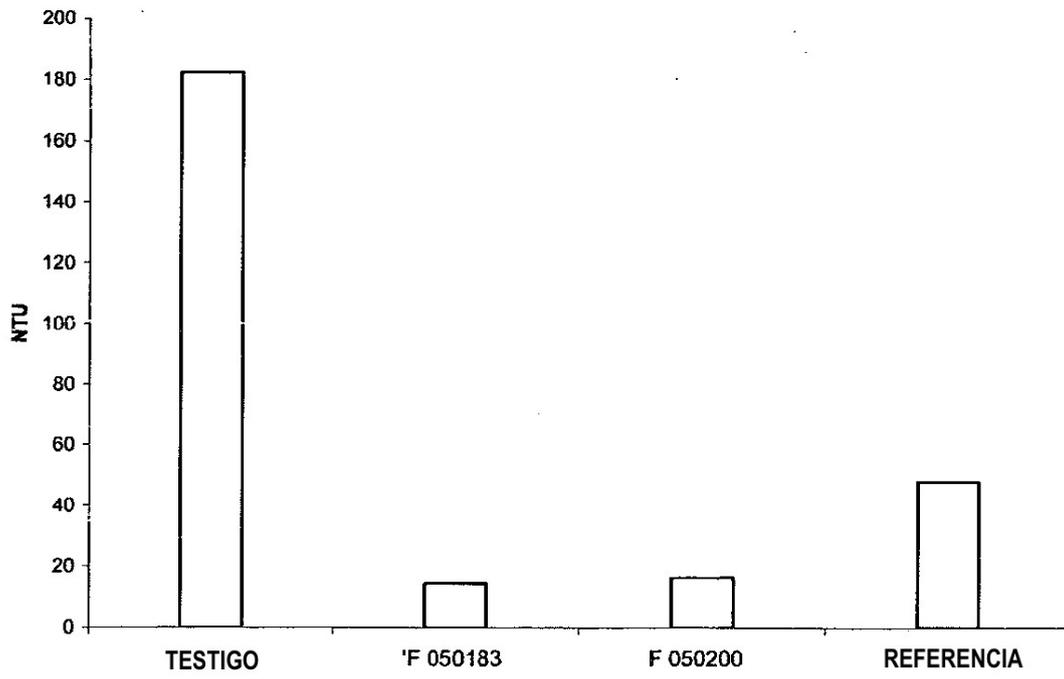


Figura 5

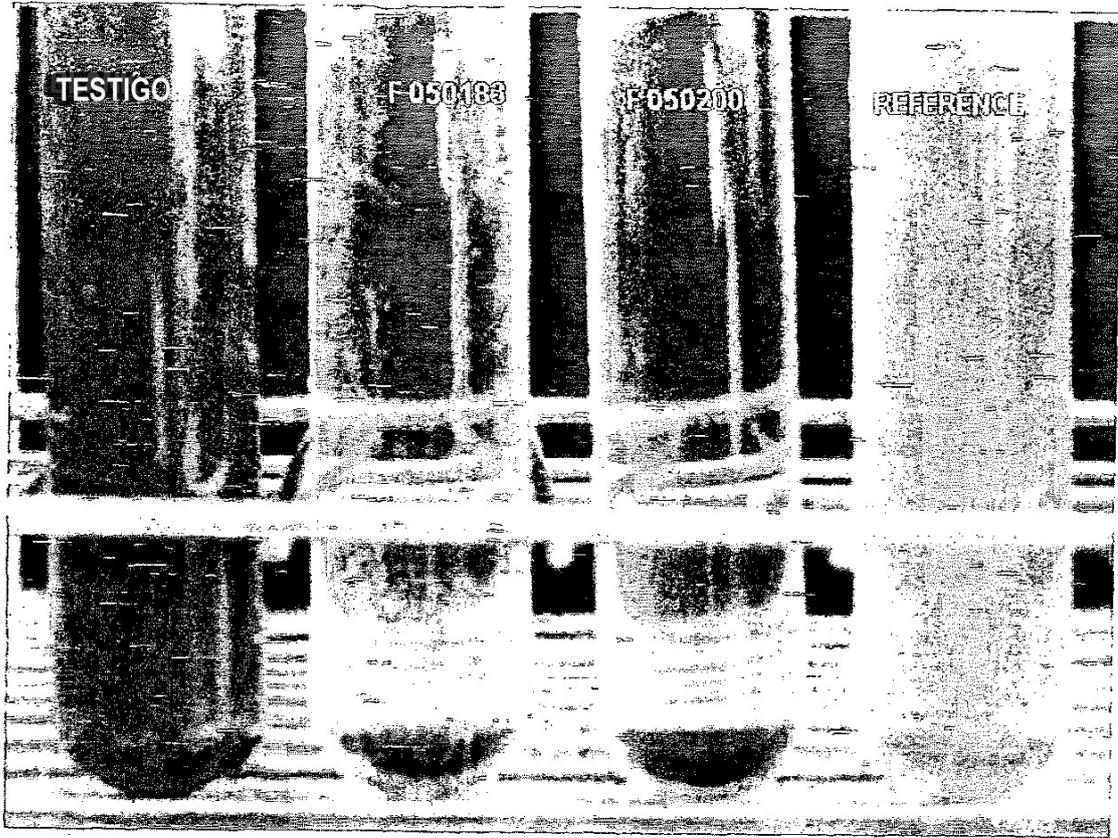


Figura 6

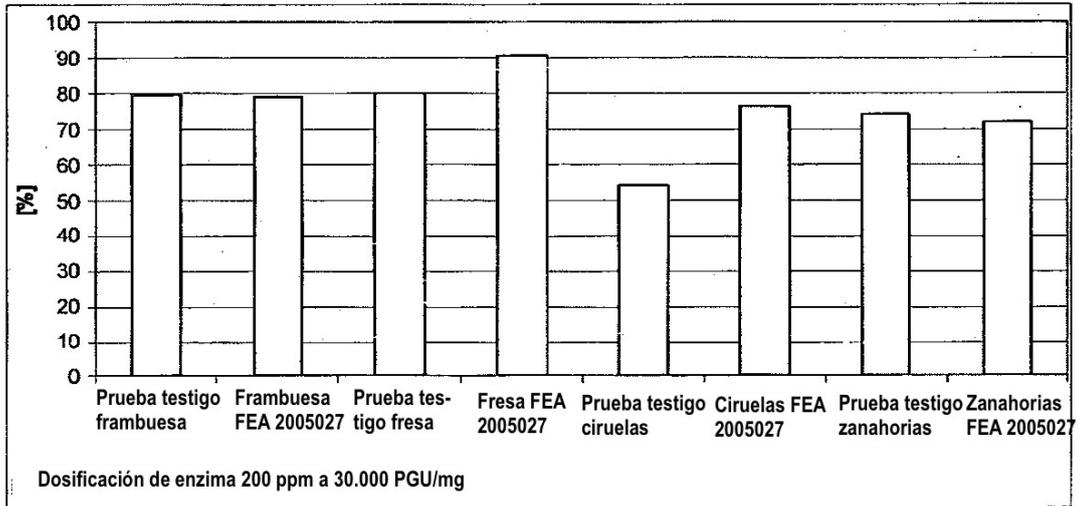


Figura 7