



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 145 691**

⑫ Número de solicitud: 009800292

⑬ Int. Cl.⁷: C12N 15/31
C07K 14/37

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑭ Fecha de presentación: **13.02.1998**

⑮ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2000**

Fecha de concesión: **29.12.2000**

⑯ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2001**

⑰ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.03.2001

⑱ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edf. Convalecencia, 3 Planta
30003 Murcia, ES

⑲ Inventor/es: **Torres Martínez, Santiago y**
Navarro Ros, Eusebio

⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

㉑ Título: **Nuevo gen de *mucor circinelloides*, plásmido que lo contiene y su utilización en la producción de carotenoides.**

㉒ Resumen:

Nuevo gen de *mucor circinelloides*, plásmido que lo contiene y su utilización en la producción de carotenoides.

Dicho gen tiene características de gen regulador y posee una secuencia total de 2807 nucleótidos que codifica una secuencia total de 535 aminoácidos correspondiente a una proteína con características de proteína reguladora. El plásmido pVEN121, porta la secuencia completa de dicho gen y se ha utilizado para obtener *Escherichia coli* DH5 α con plásmido pVEN121, depositada como CECT4971.

El gen tiene utilidad en la obtención de estirpes transformantes de *M. circinelloides* superproductoras de carotenoides.

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 – 28036 Madrid

ES 2 145 691 B1

DESCRIPCION

Título de la invención

5 Nuevo gen de *mucor circinelloides*, plásmido que lo contiene, y su utilización en la producción de carotenoides.

Campo técnico de la invención

10 La presente invención, se encuadra dentro del amplio campo de la Ingeniería Genética.

Más concretamente, la presente invención se refiere al aislamiento de un gen de *Mucor circinelloides* y a su utilización para obtener estirpes transformantes de hongos mucorales superproductoras de carotenoides.

15 Los resultados obtenidos en la presente invención son de gran importancia industrial en el sector de la alimentación humana y animal, donde los colorantes químicos sintéticos son cada vez más rechazados.

Estado de la técnica anterior a la invención

20 El hongo *Mucor circinelloides*, al igual que otros hongos mucorales, como *Phycomyces blakesleeanus* y *Blakeslea trispora*, y otros muchos organismos, produce β -caroteno. En el caso de *M. circinelloides*, la producción de β -caroteno está estimulada por la luz [(1) Navarro E, y col. 1.995. Exp. Mycol. 19:186-190; (2) Fraser PD, y col. 1.996 Biochim. Biophys. Acta 1289:203-208]. En *M. circinelloides*, la producción de β -caroteno a partir de fitoeno, el primer carotenoide de la ruta biosintética, parece depender de sólo
25 dos genes estructurales que cifran las enzimas desaturasa de fitoeno y ciclase de licopeno. La primera realizaría cuatro reacciones de deshidrogenación sucesivas, dando lugar a licopeno, y la segunda realizaría dos ciclaciones sucesivas a partir de éste, dando lugar a β -caroteno. Existen mutantes presumiblemente afectados en dichos genes, que acumulan fitoeno o licopeno como productos mayoritarios [(1) y (2)]. La ruta biosintética debe estar controlada por genes reguladores, ya que se han encontrado mutantes afectados
30 en la producción total final de β -caroteno y en la respuesta a la luz [(1) y (2)].

La producción biológica de carotenoides, principalmente β -caroteno, es de gran interés debido a la creciente demanda de este tipo de pigmentos como aditivos para las industrias relacionadas con la alimentación y la fabricación de piensos para piscifactorias y al rechazo cada vez mayor a la utilización, como
35 aditivos, de productos obtenidos por síntesis química. El desarrollo de métodos que originen incrementos de producción de carotenoides posee por tanto una gran importancia industrial.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere al aislamiento de un gen de *Mucor circinelloides*, desconocido hasta la fecha, y a la aplicación del mismo en la producción industrial de β -caroteno.

45 Más específicamente, en la presente descripción se hace referencia a un nuevo procedimiento para la obtención de estirpes de hongos mucorales (por ejemplo, *Mucor circinelloides*), con mayor capacidad de producción de carotenoides, como β -caroteno o licopeno.

Lo anterior es posible gracias al aislamiento de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) del mencionado hongo, que contiene una secuencia con las características de gen regulador y que de ahora
50 en adelante se referirá como *crgA*. La secuencia de aminoácidos que se deduce del análisis de la secuencia de nucleótidos de dicho gen no muestra homología con ninguna otra proteína conocida. Tampoco existe en la literatura descripción previa de la secuencia de nucleótidos correspondiente a ese gen, ni de su utilización para la mejora de la producción de β -caroteno por microorganismos, como *M. circinelloides* u otros mucorales.

55 La introducción de secuencias del gen *crgA* mediante técnicas de ADN recombinante en estirpes de *M. circinelloides*, silvestres para la carotenogénesis, da lugar a organismos transformantes que presentan una producción incrementada de carotenoides con respecto a las estirpes de control sin transformar.

60 De hecho, se ha observado un aumento de producción de carotenoides, tanto en la luz como en oscuridad, en estirpes silvestres (blanquecinas en la oscuridad y amarillas en la luz) y en mutantes afectados en la producción de β -caroteno (blanquecinas en la oscuridad y rojas en la luz, por acumulación de licopeno).

Concretamente ha podido observarse que la transformación con secuencias del gen *crgA* de una estirpe de *M. circinelloides*, silvestre para la carotenogénesis, provoca una sobreproducción de β -caroteno en la oscuridad de hasta 30 veces la cantidad producida por la misma estirpe sin transformar, en las mismas condiciones. Por otra parte, la introducción del gen en una estirpe mutante que solo acumula licopeno en la luz, provoca una sobreproducción similar de licopeno en la oscuridad.

Es evidente, por tanto, la utilidad que presenta el gen *crgA* para aumentar la producción de carotenoides en organismos productores de dichos pigmentos.

A continuación se expone de forma más detallada el aislamiento del gen *crgA* y su introducción en estirpes mucorales, para obtener estirpes transformantes superproductoras de carotenoides.

El ADN genómico de la estirpe R7B de *M. circinelloides* [(3) Roncero MIG, 1984. Carlsberg Res. Commun. 49:685-690] fue digerido parcialmente con la enzima de restricción *SacI* y con los fragmentos resultantes se construyó una genoteca parcial en el plásmido pLEU4 [(4) van Heeswijck R y Roncero MIG, 1984. Carlsberg Res. Commun. 49:597-609], siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook [(5) Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA]. El plásmido pLEU es plásmido autorreplicativo, que no se integra en el genoma de *M. circinelloides*. La genoteca se utilizó para transformar una estirpe de *M. circinelloides* mutante, de color blanquecino en la oscuridad y rojizo en la luz, debido a la acumulación de licopeno (1). En uno de los experimentos de transformación se observó un transformante que, en la oscuridad, presentaba un color rojo intenso. Este transformante, expuesto a la luz, presentaba una coloración roja aún más intensa que la de la estirpe utilizada como receptora en los experimentos de transformación. El ADN del transformante se utilizó para transformar una estirpe de *Escherichia coli*, seleccionando la resistencia al antibiótico ampicilina, presente en el plásmido pLEU4. El carácter autorreplicativo (no integrativo) del plásmido pLEU4 facilitó el aislamiento de un transformante de *E. coli* que portaba un plásmido recombinante con el inserto de ADN de *M. circinelloides* responsable de la sobreproducción de carotenoides. Dicho fragmento, de aproximadamente 7kb, se cartografió con varias enzimas de restricción y seguidamente se realizaron experimentos de subclonación con los diferentes fragmentos resultantes. De estos experimentos se dedujo que la secuencia responsable de la sobreproducción de carotenos estaba contenida en un fragmento *XhoI-SacI* de 2.85 kb. Una vez secuenciado, se comprobó la existencia de dos marcos de lectura abierta (ORF) truncados, uno en su extremo 5' (ORF1) y otro en su extremo 3' (ORF2). Una posterior subclonación demostró que ésta última era la responsable del fenotipo "constitutivo". Mediante la técnica de paseo cromosómico con PCR se clonó y secuenció en su totalidad el gen correspondiente a la ORF2. De dicha ORF completa se deduce una secuencia de 535 aminoácidos, que sometida a una comparación en la base de datos (EBI) no muestra homología con ninguna proteína conocida. El gen correspondiente a este ORF se denominó *crgA*. La versión completa del gen *crgA* está incluida en un inserto de 2.8 kb, clonado en el plásmido pVEN121. Este plásmido, introducido en una estirpe de *M. circinelloides* silvestre para la carotenogénesis, produce también un notable incremento en la síntesis de β -caroteno, tanto en la oscuridad como en la luz. No existe restricción aparente para que el mismo plásmido pueda ser introducido en otros hongos relacionados, productores de carotenoides, como *P. blakesleeanus* y *B. trispora*, en los que se podría esperar un efecto similar. La aplicación, por tanto, de este procedimiento a estirpes de interés comercial, como *Blakeslea trispora*, debería ser inmediata por cualquier experto en la técnica.

Los cultivos de *M. circinelloides* y el análisis y cuantificación de los carotenos se hicieron en la forma descrita por Navarro E., y col.(1). Los experimentos de transformación de *M. circinelloides* se realizaron en la forma descrita por van Heeswijck, [(6) Heeswijck, R col. 1984. Carlsberg Res. Commun. 49:691-702]. Los experimentos de transformación de *E. coli* se realizaron en la forma descrita en Sambrook (5). Un transformante de *E. coli* con el plásmido pVEN121 ha sido depositado el 14 de Noviembre de 1997 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio Investigación de las Facultades de Ciencias, Campus de Burjassot (46100 Burjassot, Valencia) con el número CECT 4971.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Muestra un mapa físico simplificado de la región genómica de *M. circinelloides* donde se encuentra el gen *crgA*. Las abreviaturas EcoRI, PstI, etc. son abreviaturas convencionales de enzimas de restricción. Se indica el tamaño aproximado en kilobases (kb) de ADN de acuerdo con los resultados obtenidos en electroforesis en gel de agarosa. En esta figura no se muestran todos los sitios de restricción presentes. El ADN presente en la invención puede ser introducido en cualquier vector adecuado por métodos conocidos, por ejemplo por combinación directa de extremos cohesivos, utilizando colas homo-

poliméricas, etc.

Figura 2: Muestra un esquema del plásmido pVEN121. Este plásmido, que porta una versión completa del gen *crgA*, se mantiene de forma autorreplicativa en *M. circinelloides*.

Figura 3: Muestra la secuencia de nucleótidos del gen *crgA* (un total de 2807 nucleótidos, incluyendo secuencias aguas arriba y abajo de la región codificante), así como la secuencia de aminoácidos que se deduce de ella (un total de 535 aminoácidos).

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

*Preparación de plásmidos recombinantes portadores de secuencias del gen *crgA*.*

La secuencia de ADN de *M. circinelloides* que provoca el incremento en la producción de carotenoides se aisló en un experimento de transformación de una estirpe mutante de dicho hongo. La estirpe mutante acumulaba pequeñas cantidades de licopeno en la oscuridad (24 µg/g peso seco; fenotipo blanquecino) y diez veces más cantidad del mismo pigmento en luz (fenotipo rojizo). El transformante presentaba una coloración roja intensa en la oscuridad y en la luz, debido a la sobreproducción de licopeno en ambas condiciones (760 µg/g materia seca y 1100 µg/g m, seca, respectivamente). El plásmido recombinante (pVEN100), responsable de dicho fenotipo portaba un fragmento *SacI* de aproximadamente 7 kb de ADN de *M. circinelloides*. Para localizar, en ese fragmento, la secuencia responsable de dicho fenotipo “constitutivo”, el fragmento *SacI* se dividió en dos regiones, una de aproximadamente 4 kb y otra de 2,85 kb, utilizando un sitio único de restricción *XhoI* interno. La transformación con ambos fragmentos de forma independiente demostró que la secuencia responsable del fenotipo estaba en el fragmento de 2,85 kb (plásmido pVEN101). Una vez secuenciado y analizado se comprobó que este fragmento portaba dos fases de lectura abiertas (ORF) truncadas, una en su extremo 5’ (ORF1) y otra en su extremo 3’ (ORF2). Una posterior subclonación del fragmento demostró que la secuencia truncada (P369) en su extremo 3’ (ORF2; plásmido pVEN114) era la responsable del fenotipo constitutivo. El plásmido pVEN114, deriva por lo tanto de pVEN100 y contiene una versión truncada del gen *crgA* (P369). El plásmido pVEN121 contiene la versión completa de dicho gen. Para construir este plásmido, el ADN genómico de *M. circinelloides* se digirió con la enzima *HpaII*. Esta enzima corta en la ORF1 antes mencionada y unas 2 kb aguas abajo de la ORF2, por lo que el fragmento generado con dicho corte debe contener, en principio, la ORF2 completa. Una vez cortado con la enzima *HpaII*, el ADN de *M. circinelloides* se autiligó para permitir la formación de moléculas circulares que contuviesen la ORF2 y sus secuencias adyacentes aguas abajo. Estas secuencias adyacentes al extremo 3’ de la ORF2 se amplificaron por PCR, utilizando oligonucleótidos complementarios a regiones próximas al sitio de corte *HpaII* presente en la ORF1 y al final de la versión truncada de la ORF2. De esta forma se amplificó un fragmento previsto de 2,1 kb, que se clonó en el sitio *SmaI* del vector pUC18. El plásmido resultante se denominó pVEN118. A partir de éste, se obtuvo un fragmento *PstI* de 4,1 kb, que contenía secuencias correspondientes a pUC18, 0,140 kb de la región C-terminal de la ORF2 truncada y la región adyacente amplificada, de 1,25 kb. Este fragmento 4,1 kb se autiligó, generándose el plásmido pVEN120. Un fragmento *BglIII-ScaI* de 2,3 kb de pVEN120, que incluía la extensión de la ORF2 amplificada, se ligó con un fragmento *BglIII-ScaI* de 7,6 kb del plásmido pVEN114, que contenía la ORF2 truncada. Se generó así una construcción en la que se fusionaron la ORF2 truncada y su extensión aguas abajo, hasta completar el gen. El plásmido resultante se denominó pVEN121 (figura 2).

El plásmido pVEN131 contiene una versión truncada del gen *crgA* (P519). Dicha versión carece de los 48 pb de la región 3’ terminal del gen *crgA*. El producto proteínico correspondiente debe carecer de los últimos 16 residuos del extremo COOH. Para construir este plásmido, se purificó un fragmento *BamHI* de 3,3 kb del plásmido pVEN118 y se autiligó, eliminando así los últimos 48 bp de la región 3’ terminal de *crgA*. El plásmido resultante se denominó pVEN130. Este plásmido contiene el fragmento de 0,6 kb de *crgA* situado justo aguas arriba del sitio de corte *BamHI* utilizado para eliminar la región terminal. Un fragmento *BglIII-ScaI* de 1,5 kb del plásmido pVEN130, que incluye dichos 0,6 kb de *crgA* se ligó con un fragmento *BglIII-ScaI* de 7,6 kb del plásmido pVEN114. El plásmido resultante, que porta la versión de *crgA* truncada en sus últimos 48 bp, se denominó pVEN131.

Los cultivos de *E. coli* y todas las manipulaciones del ADN se hicieron siguiendo las instrucciones de

las respectivas casas comerciales y de acuerdo con los protocolos descritos por Sambrook, (5).

Ejemplo 2

5 Sobreexpresión de las secuencias *crgA* en *M.circinelloides*

Una vez caracterizado el gen *crgA*, el siguiente objetivo fue sobreexpresarlo en *M. circinelloides*. La transformación de *M. circinelloides* se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por van Heeswijk, (6). Para analizar los carotenoides acumulados por los transformantes, éstos se incubaron en la oscuridad, a 24°C, durante 72 horas, o en la luz durante 24 horas, tras haber estado previamente incubados en la oscuridad durante 48 horas. Los carotenos se analizaron según se indica en Navarro E., y col. (2).

En la siguiente Tabla se muestran los carotenos acumulados por la estirpe silvestre de *M. circinelloides* sin transformar y transformada con los plásmidos que portan la versión silvestre del gen *crgA* (pVEN121) o versiones truncadas del mismo (P369, plásmido pVEN101 y P519, plásmido pVEN131).

TABLA

Análisis de estirpes de *M. circinelloides* transformadas con plásmidos que portan la versión completa del gen *crgA* (pVEN121) o versiones truncadas del mismo (P519, pVEN131;P369, pVEN101).

Para analizar el contenido de β -caroteno, los micelios se incubaron en la oscuridad durante 72 h (O) ó 48 h en la oscuridad y después 24 h en la luz (L).

Todos los valores son medias de dos experimentos distintos.

Plásmido (construcción)	β -caroteno (peso seco, $\mu\text{g/g}$)	
	O	L
ninguno (control)	54	295
pVEN121 (completa)	637	1656
pVEN131 (P519)	1266	2142
pVEN101 (P369)	1548	2322

Lista de secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE MURCIA

<120> Nuevo gen de *Mucor circinelloides*, plásmido que lo contiene, y su utilización en la producción de carotenoides

<130> 9800292/9

<140> P-9800292

<141> 1998-02-13

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

ES 2 145 691 B1

<210> 1

<211> 2807

5 <212> ADN

<213> Escherichia coli CECT 4971

10 <220>

<221> gene

<222> (443)..(2048)

15

<400> 1

```

20      ggcccttttt ggtttttgan ctctctcttt ctaatttttt ttctactatt gttcgttgctc 60
      atggcaaccg catttaattc tatcgtcatc tagcagaata catcacttta tgaagacatt 120
      tacactttat taagccctct ttttttcttt ttctttgcta taaaacctct ctctctcttt 180
25      tactctttca tttttttttc tctttctttt tctgaaacaa gaaagcacat ttcgtaaaaag 240
      tgcaaagcat tcgacacaac aaacgggttc gcgaccaggt ggactcgatt cctgctgcag 300
      accatcaaca actcaagaaa caaaagcaac aaacacacca tatattagag ccttttcagg 360
30      tcgtcgaggc attgaccaag tgccccatt gccatggaaa gctcaacaag ccaacaacat 420

      taccctgtgg attcacagtg tgtatgaatt gtatcccaga tgaatccgtc tgtattgctc 480
35      ctcagtgcga tcgtatccat acaacgggtc tccagcctaa cgtcaccatc caagccatgc 540
      aagcgattgt ggtttcattc gaagcatctc actcactaga cgccttgctc aaaagcttga 600
      atgtgccgac agaatgtccc atttgctgca ctcgattcac caatgcaaca acaacaccct 660
40      gtggacatgt cttttgcaga aactgccttg tgcgctcgct ggatcatcag cgctcttgct 720
      cgttctgcag agatagcttg gaattctgcc ctccaccaac gaaaatcctt gttgatttat 780
      tatcgcaact ctacgccaac gacgatgaaa cggatgatgc attggatctt gatcccaact 840
45      ttgaatcaga gcacagagtg ccactgctta tcggcagcat gtcatttcct caggtcaatt 900
      gcgccatcca cgtattcgag ccaagatacc gcctcatgtt gcgcagaatc atggcatcca 960
      gcagaagacg atttgccatg tgcctggccc gcagaaagcg aagcgaaggc gaaccgccat 1020
50      tctttgaata cggcactatt ttggaattaa tgcacgttca aaccttatca gacggcagat 1080
      cgattgtgga ggctgttgga tcccaccgat ttagagttgc aaactttgaa ttgacagatg 1140
      gctatcatat ggctgatatt gaacgaatcg acgacattga cagagagcaa gaacacatgc 1200
55      tggagcaaca acagatcctc agagccagtg cattgagagt gcgtcaagct cagcaacagc 1260
      aacagcaaca gcaacagcag cagcaacaag cgcctccaca accacagcct cagcctgctc 1320
      gtcccacagc agctcctcaa cccatggctg caagacctag atccatgatg cctgctcgct 1380
60      ccatgtctgc tagtctcgct cgtcccatgg caagacctat gatggcaaga tcttcgggtca 1440
      gtatgcaaag accacctcag caacagcaac aacaagcaca gatgatgggc cagcgtcgct 1500

```

ES 2 145 691 B1

```

cttgggcaca gcaagcacat cctcagacac agccccaagt cagtagagct ccctggcagc 1560
aaatgcatgt tcaaggtctg tctgctgctc ggcctaaacc tcatatggtg tctcaacaac 1620
5  cacaaccaca acagcaacaa cagcaacagc ccgtggcgat tcctgaaaag gtcatacaaga 1680
accgtcaaga gcaatccact gacgagatcc tggatgaatt ggccacattc attgaagagc 1740
tgatgagaca caaaagccag aatcctagcg acggcatgtc tagctggctg ggcgccttgg 1800
10 gagatcccc tacgctgcga ggtcctcagc gtgatcgagt catctttact tgggtggatcg 1860
tgaatctcat gcctttgggc gaagaagaaa agtatccctt gctggccatg cgcactattc 1920
gtgaaagagt cttgaccatc atctcttggg tggatcgctt ccaagaccaa tggtccttgt 1980
15 tcctaaacaa ccaggatcc tcctcctcgt ccaatccagc tcaaccgcct gtctcttgtt 2040
gtatttctta atcattatta ttatttatat tcattcattt ctacatactt gttttattat 2100
tatgctttct gtactatatt gttatattta atctattctt cccccctcct ccttattgcc 2160
20 tcctattgat ctccccctat accttttcat catgacacat atttttttca tcttttgtcc 2220
gtacatccat catatataaa accaaaatgt attctgtcat atatcccaa actaaaaccg 2280
caacacagaa tcatatgcca ttatacattc ctttcttcaa gaataaaaaac attatttatg 2340
25 tgattttata atttgtgagc atagaaattg ggaggggggc atagcaatca ctttcagcaa 2400
ttgtaaacad ataagcaagc ataatttaaa gggggcagta gtgaaacaat aatagtaggg 2460
agtcgttttc atatcaggat ggagccgtgt tgttgggttt gcggtatcaa ggcgatcttc 2520
30
tccttttggc catgtcagag gcggtggtct ctactgtatt atcgtcctgt ttacaaagaa 2580
gggatctcaa tacacgattc tagaagttca cagtcaatgg ggtagaatc ttccatgcaa 2640
35 tttccccctt ggatggtgtc atcgtcttac ttctatctcc aaatcatgga ttctttgctt 2700
cagtttgtcc acctcatctt cgtccgtgtt ggggtgcatta ttgaaggga ggatgaatgg 2760
caaaggggtt gtaggtgaat gaatgccatt gtgagaagtt gctgcag 2807

```

<210> 2

<211> 535

45 <212> PRT

<213> Escherichia coli CECT 4971

50 <400> 2

```

Met Asn Cys Ile Pro Asp Glu Ser Val Cys Ile Ala Pro Gln Cys Asp
55      1              5              10              15
Arg Ile His Thr Thr Val Leu Gln Pro Asn Val Thr Ile Gln Ala Met
60      20              25              30

```

ES 2 145 691 B1

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

ES 2 145 691 B1

Ser Asp Gly Arg Ser Ile Val Glu Ala Val Gly Ser His Arg Phe Arg
 210 215 220
 5
 Val Ala Asn Phe Glu Leu Thr Asp Gly Tyr His Met Ala Asp Ile Glu
 225 230 235 240
 10
 Arg Ile Asp Asp Ile Asp Arg Glu Gln Glu His Met Leu Glu Gln Gln
 245 250 255
 15
 Gln Ile Leu Arg Ala Ser Ala Leu Arg Val Arg Gln Ala Gln Gln Gln
 260 265 270
 20
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala Pro Pro Gln Pro Gln
 275 280 285
 25
 Pro Gln Pro Ala Arg Pro Thr Ala Ala Pro Gln Pro Met Ala Ala Arg
 290 295 300
 30
 Pro Arg Ser Met Met Pro Ala Arg Pro Met Ser Ala Ser Leu Ala Arg
 305 310 315 320
 35
 Pro Met Ala Arg Pro Met Met Ala Arg Ser Ser Val Ser Met Gln Arg
 325 330 335
 40
 Pro Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala Gln Met Met Gly Gln Arg Arg
 340 345 350
 45
 Ser Trp Ala Gln Gln Ala His Pro Gln Thr Gln Pro Gln Val Ser Arg
 355 360 365
 50
 Ala Pro Trp Gln Gln Met His Val Gln Gly Leu Ser Ala Ala Arg Pro
 370 375 380
 55
 60

ES 2 145 691 B1

Lys Pro His Met Val Ser Gln Gln Pro Gln Pro Gln Gln Gln Gln Gln
 385 390 395 400
 5
 Gln Gln Pro Val Ala Ile Pro Glu Lys Val Ile Lys Asn Arg Gln Glu
 405 410 415
 10
 Gln Ser Thr Asp Glu Ile Leu Asp Glu Leu Ala Thr Phe Ile Glu Glu
 420 425 430
 15
 Leu Met Arg His Lys Ser Gln Asn Pro Ser Asp Gly Met Ser Ser Trp
 435 440 445
 20
 Leu Gly Ala Leu Gly Asp Pro Pro Thr Leu Arg Gly Pro Gln Arg Asp
 450 455 460
 25
 Arg Val Ile Phe Thr Trp Trp Ile Val Asn Leu Met Pro Leu Gly Glu
 465 470 475 480
 30
 Glu Glu Lys Tyr Pro Leu Leu Ala Met Arg Thr Ile Arg Glu Arg Val
 485 490 495
 35
 Leu Thr Ile Ile Ser Trp Val Asp Arg Phe Gln Asp Gln Trp Ser Leu
 500 505 510
 40
 Phe Leu Asn Asn Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Asn Pro Ala Gln Pro
 515 520 525
 45
 Pro Val Ser Cys Cys Ile Ser
 530 535
 50
 55
 60

REIVINDICACIONES

1. Un gen denominado *crgA* de *Mucor circinelloides* **caracterizado** por la SEQ ID N°1 codificante de una proteína reguladora de la carotenogénesis.

5

2. Una proteína codificada por el gen *crgA* de *Mucor circinelloides*, según la reivindicación 1, **caracterizada** por la SEC ID N°2.

3. Un plásmido, denominado pVEN121, **caracterizado** porque porta el gen completo *crgA*, como se representa en la Figura 2.

10

4. Una nueva bacteria, depositada como CECT 4971, **caracterizada** por ser *Escherichia coli* DH5 α con plásmido pVEN121.

15

5. Utilización del gen *crgA* de la reivindicación 1, para la obtención de estirpes transformantes de *Mucor circinelloides* superproductoras de carotenoides (β -caroteno y licopeno).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

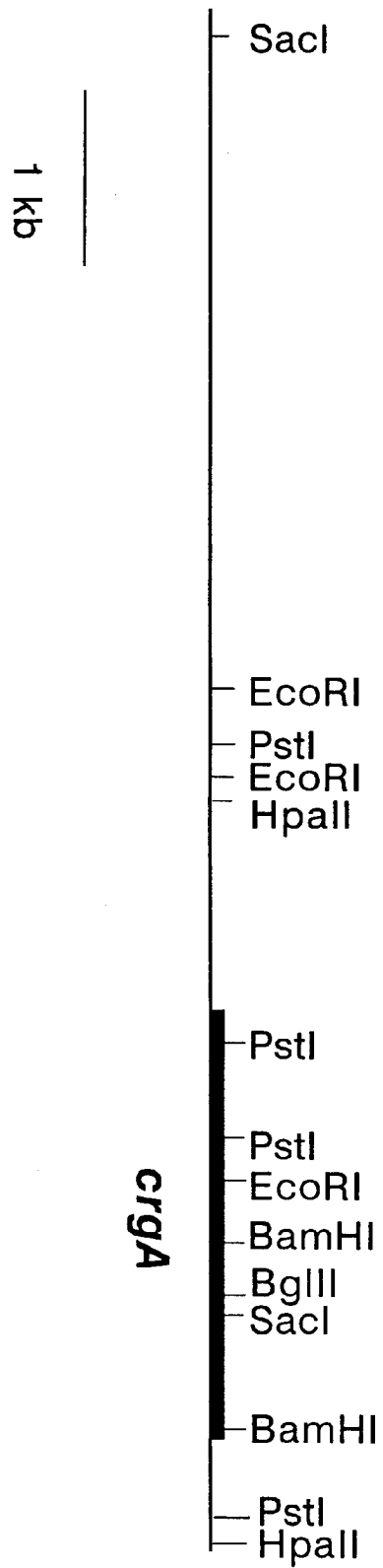


Figura 1

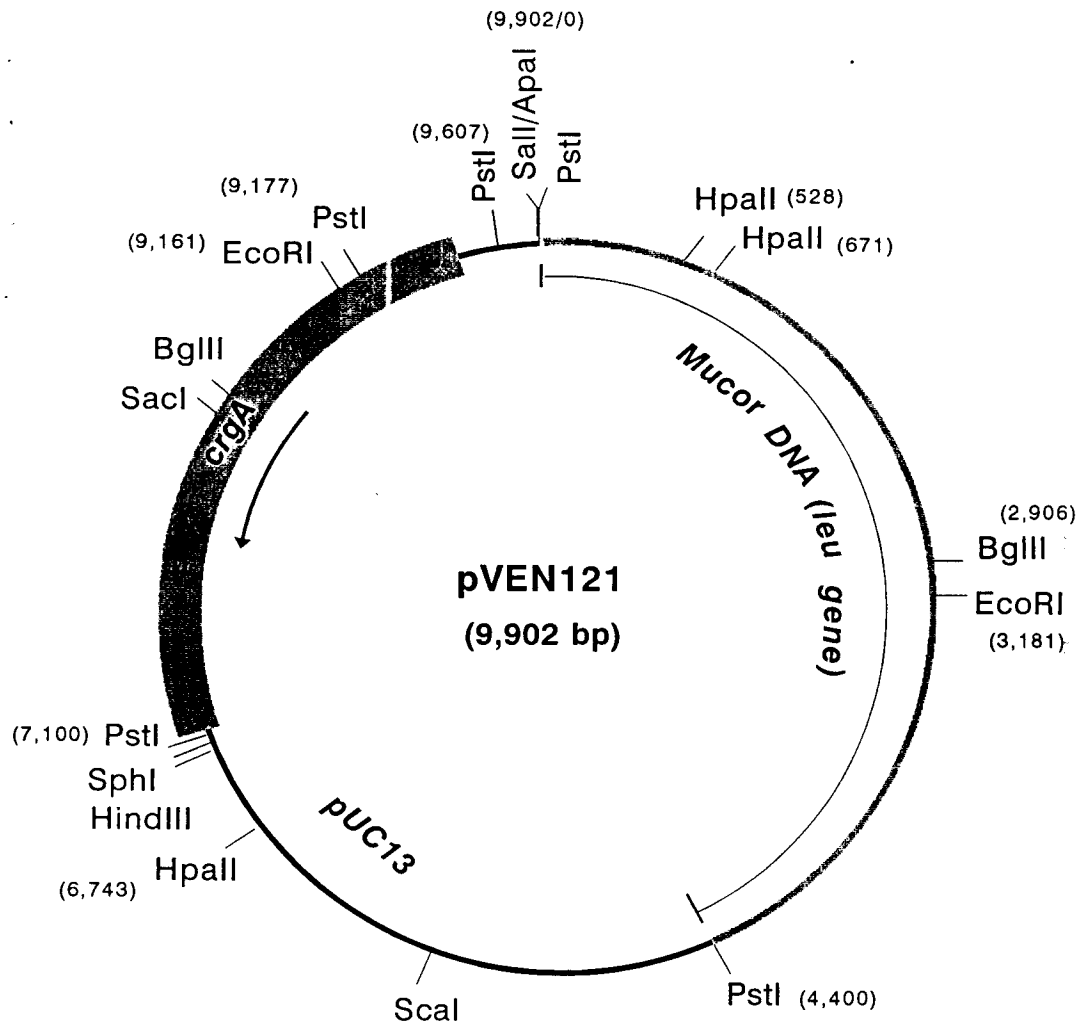


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 145 691
⑫ N.º solicitud: 009800292
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 13.02.1998
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/31, C07K 14/37

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FRASER, P.D. et al. "Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of <i>Mucor circinelloides</i> ", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1996, Vol. 1289, N° 2, páginas 203-208. Todo el documento.	
A	BOTELLA, J.A. et al. "A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in <i>Myxococcus xanthus</i> ", EUR. J. BIOCHEM., 1995, Vol. 233, páginas 238-248. Todo el documento.	
A	HODGSON, D.A. "Light-induced carotenogenesis in <i>Myxococcus xanthus</i> : genetic analysis of the carR region", MOLECULAR MICROBIOLOGY, 1993, Vol. 7, N° 3, páginas 471-488. Todo el documento.	
A	McGOWAN, S.J. et al. "Light-induced carotenogenesis in <i>Myxococcus xanthus</i> : DNA sequence analysis of the carR region", MOLECULAR MICROBIOLOGY, 1993, Vol. 10, N° 4, páginas 713-735. Todo el documento.	
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones n°:		
Fecha de realización del informe 18.05.2000	Examinador J.L. Vizán Arroyo	Página 1/1