



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 370**

51 Int. Cl.:
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07704957 .5**
96 Fecha de presentación : **23.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1979473**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2008**

54 Título: **Galactosidasa con actividad α -galactosiltransferasa.**

30 Prioridad: **31.01.2006 GB 0601901**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2011

73 Titular/es: **CLASADO Inc.**
Edificio Interseco, Piso 2
c/ Elvira Méndez Apartado 0816-01560
Panamá, PA

72 Inventor/es: **Tzortzis, Georgios;**
Goulas, Athanasios, K. y
Goulas, Theodoros

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 370 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

Galactosidasa con actividad α -galactosiltransferasa.

PRODUCTO Y PROCEDIMIENTO

5 La invención se refiere a una β -galactosidasa con actividad transgalactosilante capaz de convertir la lactosa en una mezcla de oligosacáridos con uniones β y que produce inesperadamente el disacárido α 1-6 galactobiosa con una unión α . En particular, se refiere a una β -galactosidasa aislada de una cepa recientemente descubierta de *Bifidobacterium bifidum*.

10 La invención se refiere en particular a secuencias de ADN que codifican la enzima β -galactosidasa aislada, a la enzima codificada por tal secuencia de ADN y a una célula hospedadora que comprende la secuencia de ADN o un vector recombinante que incorpora la secuencia de ADN. La invención también se refiere al uso de la enzima codificada por una secuencia de ADN, o de la célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN o un vector recombinante, para producir oligosacáridos.

15 La bifidobacterias colonizan de forma natural el tramo intestinal inferior, un medio que tiene pocos mono- y disacáridos, ya que los azúcares los consumen preferentemente el hospedador y los microbios presentes en el tramo intestinal superior. Para sobrevivir en el tramo intestinal inferior, las bifidobacterias producen varias clases de exo- y endoglucosidasas en formas unidas a la superficie y/o extracelulares, mediante las cuales pueden utilizar diversos glúcidos.

20 Además de la actividad hidrolasa, algunas enzimas de las bifidobacterias muestran actividad transferásica. Esta actividad transglucosilante de las glucosidasas se utiliza mucho para la síntesis enzimática de diferentes oligosacáridos, que se ha demostrado que actúan como factores que favorecen el crecimiento de las bifidobacterias.

25 Se sabe que algunos miembros de las bifidobacterias producen enzimas β -galactosidásicas que intervienen en el metabolismo bacteriano de la lactosa. Møller, P. L. et al. en *Appl & Environ. Microbiol.* (2001), 62 (5), 2276-2283 describen el aislamiento y la caracterización de tres genes de β -galactosidasa de una cepa de *Bifidobacterium bifidum*. Encontraron que las tres β -galactosidasas eran capaces de catalizar la formación de galactooligosacáridos con uniones β mediante transgalactosilación.

30 Dumortier et al. en *Carbohydrate Research* 201, (1990), 115-123 describieron la formación de oligosacáridos con uniones β mediante una reacción de transgalactosilación durante la hidrólisis de la lactosa con *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456. Su análisis de la estructura de la mezcla de oligosacáridos producidos demostró que los enlaces eran β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 4) entre D-galactosilos. Dumortier sugirió que los compuestos producidos por el *Bifidobacterium bifidum* intervienen en la adhesión de las bacterias al intestino grueso.

35 Se ha encontrado que una cepa de *Bifidobacterium bifidum* es capaz de producir una actividad enzimática galactosidasa que convierte la lactosa en una nueva mezcla de galactooligosacáridos que contiene inesperadamente hasta el 35% de los disacáridos de tipo galactobiosa (Gal (α 1-6) Gal). Se sabe que un disacárido similar, galabiosa (Gal (α 1-4) Gal) (véase Paton, J. C. y Paton A, W (1998) *Clin. Microbiol. Revs.* 11, 450-479; Carlsson, K. A. (1989) *Ann. Reviews Biochem.* 58, 309-350), es un antiadherente capaz de impedir la adhesión de toxinas, por ejemplo la toxina Shiga, y patógenos, tales como *E. coli*, a la pared del intestino.

Esta cepa de *B. bifidum* se depositó con el número de acceso NCIMB 41171 en la National Collection of Industrial & Marine Bacteria, Aberdeen, Reino Unido, el 31 de marzo de 2003. También se describe en la patente del Reino Unido n.º 2 412 380.

40 Ahora se ha encontrado que esta cepa de *B. bifidum* produce varias β -galactosidasas, una de las cuales muestra inesperadamente actividad α -galactosiltransferasa. Esta enzima produce una serie de oligosacáridos diferentes con uniones β , pero también produce la galabiosa, un disacárido con unión α .

De acuerdo con la invención, se da a conocer una secuencia de ADN que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos como la ofrecida en la SEQ ID n.º 2. La secuencia de ADN se ofrece en la SEQ ID n.º 1.

45 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se da a conocer una enzima codificada por una secuencia de ADN como la definida anteriormente. Tal enzima puede comprender la secuencia de aminoácidos ofrecida en la SEQ ID n.º 2.

50 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se da a conocer un vector recombinante, preferentemente un vector de expresión, que comprende una secuencia de ADN como la definida anteriormente. Tal vector se puede incorporar en una célula hospedadora, tal como una célula bacteriana, de levadura u de hongo. Alternativamente, la secuencia de ADN se puede incorporar en tal célula hospedadora. Se puede seleccionar una célula hospedadora adecuada entre *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, por ejemplo *Bacillus subtilis* o *Bacillus circulans*, *Escherichia* y *Aspergillus*, por ejemplo *Aspergillus niger*.

Utilizando la lactosa como sustrato, la enzima codificada por una secuencia de ADN como la definida anteriormente

produce una mezcla de disacáridos que comprende Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal y Gal (α 1-6) Gal. También se encuentran presentes en la mezcla de oligosacáridos los trisacáridos Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, el tetrasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc y el pentasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc.

- 5 La enzima o la célula hospedadora que se han definido anteriormente se pueden utilizar para producir una mezcla de disacáridos, que incluyen Gal (α 1-6) Gal (galabiosa) que puede formar parte de un producto que mejora la salud del intestino. Tal producto se puede seleccionar entre el grupo que consiste en productos lácteos (por ejemplo, leche líquida, leche en polvo seco tal como leche en polvo entera, leche en polvo desnatada, leche en polvo reconstituida, suero en polvo, leches infantiles, fórmulas para bebés, helado, yogur, queso, productos lácteos fermentados), bebidas tales como zumo de frutas, alimentos infantiles, cereales, pan, galletas, golosinas, pasteles, complementos alimenticios, complementos dietéticos, productos comestibles simbióticos, productos comestibles prebióticos, alimentos para animales, alimentos para aves de corral o de hecho cualquier otra comida o bebida.

- 15 Alternativamente, los oligosacáridos así producidos se pueden utilizar para preparar un medicamento, por ejemplo en forma de comprimido o cápsula, para impedir la adhesión de los patógenos o de las toxinas producidas por los patógenos a la pared de intestino. El medicamento se puede administrar a un paciente, por ejemplo, después de un ciclo de tratamiento con antibióticos que a menudo altera o incluso destruye la flora normal del intestino sano.

- 20 De acuerdo con aún otro aspecto de la invención, se da a conocer un procedimiento para producir una enzima como la definida anteriormente que comprende cultivar una célula hospedadora como la definida anteriormente en un medio de cultivo adecuado en unas condiciones que permiten la expresión de la enzima y recuperar la enzima resultante del cultivo.

La invención también se dirige a un procedimiento para producir una mezcla de oligosacáridos, entre ellos el disacárido Gal (α 1-6) Gal (galabiosa), que comprende poner en contacto la enzima como la definida anteriormente o una célula hospedadora como las definidas anteriormente con un material que contiene lactosa en condiciones que conducen a la formación de la mezcla del oligosacárido.

- 25 El material adecuado que contiene la lactosa se puede seleccionar entre lactosa disponible comercialmente, leche entera, leche semidesnatada, leche desnatada, suero de leche, leche reconstituida, impregnado de suero. Tales productos lácteos se pueden obtener de vacas, búfalos, ovejas o cabras. La leche reconstituida se define como leche entera que se ha desnatado para retirar la grasa láctea, que se reemplaza posteriormente con la adición de grasa o aceite vegetal.

30 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ ID n.º 1) de la β -galactosidasa de *Bifidobacterium bifidum* de la invención; y

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 2) que corresponde a la secuencia nucleotídica de la figura 1.

- 35 La figura 3 es un gráfico que muestra la reacción con el transcurso del tiempo durante la síntesis de galactooligosacáridos con la β -galactosidasa y lactosa al 40% (p/p) en tampón de fosfato a 0,1 M a pH 6,0 como sustrato; y

La figura 4 muestra una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución de la mezcla de galactooligosacáridos sintetizada por la β -galactosidasa de *B. bifidum* NCIMB 41171 utilizando lactosa al 40% (p/p) en tampón de fosfato a 0,1

- 40 M a pH 6,0 como sustrato (Glc = glucosa, Gal = galactosa, Lac = lactosa, α (1-6) = galactobiosa, GP = grado de polimerización).

Se aisló el ADN genómico de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) con el método de Lawson et al. (1989) *FEMS Microbiol. Letters*, 65, (1-2), 41-45. El ADN se digirió con enzimas de restricción y los fragmentos que tenían un tamaño máximo de 15 kpb se ligaron con el vector pSP72 que se había digerido con las mismas enzimas de restricción.

- 45 Las células de *E. coli* se transformaron con un vector que contenía inserciones que consistían en ADN cromosómico de *B. bifidum* digerido con *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Kpn*I, *Sma*I o *Hind*III. Los clones con actividad β -galactosidasa se seleccionaron en placas de agar Luria Bertani que contenían *p*-nitrofenilo. X- β -Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) e isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). Las mezclas de ligación con ADN cromosómico digerido con *Bam*HI dieron lugar a siete clones positivos de β -galactosidasa, uno de los cuales se identificó como pB1.

- 50 El ADN del fragmento B1 insertado se secuenció mediante el método de Sanger de terminación de la cadena con didesoxinucleótidos (Russel P., 2002 iGenetics, Pearson Education, Inc., San Francisco, 187-189) con el kit de secuenciación en ciclos BigDye Terminator V 3.0 (Applied Biosystems, EE.UU.). La secuencia del ADN de B1 se muestra en la figura 1 (SEQ ID n.º 1).

- 55 El marco abierto de lectura (ORF por las siglas en inglés) se localizó con el buscador de ORF del NCBI (National Center of Biochnology Information). La secuencia nucleotídica de la figura 1 se tradujo en los seis marcos de lectura posibles y

se identificó un marco abierto de lectura de 1052 aminoácidos que codificaba una posible β -galactosidasa. La traducción se muestra en la figura 2 (SEQ ID n.º 2).

La presente invención se describirá adicionalmente mediante la referencia al siguiente ejemplo.

Ejemplo 1

5 Material y métodos

Todas las sustancias químicas y preparaciones de medios utilizados durante este estudio se obtuvieron de Sigma (Dorset, GRB), Invitrogen (Paisley, GRB), Oxoid (Basingstoke, GRB), Qiagen (West Sussex, GRB) y Promega (Southampton, GRB).

Cepas bacterianas

- 10 La cepa de *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) se mantuvo sobre perlas criógenas en tubos de Microbank a -70°C . Para los últimos experimentos, se revivió la cepa en agar de Wilkinson Chalgren (WC) (Oxoid, GRB) y medio TPY (medio con extracto de levadura, fitona y tripticasa) y se hizo crecer en anaerobiosis (composición de CO_2 y N_2 del 80% y del 20%, respectivamente) a 37°C durante 48 horas. Se analizó la forma de las colonias y la ausencia de contaminación mediante la tinción de Gram.

15 Cepas de *E. coli*

- La cepa de *Escherichia coli* DH5a utilizada en este estudio se incubó habitualmente en condiciones aerobias a 37°C en agar o medio líquido de Luria Bertani (LB) (Sambrook J. y Russell W. D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y cuando fue necesario se complementó con antibióticos (ampicilina a $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ y/o cloranfenicol a $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$) y $40\ \mu\text{l}$ de X- β -Gal al 2% y $7\ \mu\text{l}$ de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido) al 20%, que se aplicaron en la superficie de una placa de agar de 90 mm preparada previamente.

La cepa DH5a de *E. coli* (Invitrogen, Paisley, GRB) (genotipo: $\text{F}^- \phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M } \Delta(\text{lacZYA-argF}) \text{U169 recA1 endA1 hsdR17 (r}_k^-, \text{m}_k^-) \text{phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1}\lambda^-)$ es una cepa positiva para la α -galactosidasa y se utilizó en los experimentos de expresión y para otras manipulaciones genéticas.

Extracción del ADN genómico de *Bifidobacterium bifidum*

- 25 Se aisló ADN genómico de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) utilizando el método que sigue, en el cual se preparó el ADN cromosómico a partir del sedimento de células recogido de 100 ml de medio anaerobio WC. Se resuspendieron las células en 10 ml de tampón TES (Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 10 mM, NaCl a 10 mM, pH 8) y se trataron con $200\ \mu\text{l}$ de una mezcla de lisozima y mutanolisina (4:1, lisozima a 10 mg/ml, mutanolisina a 1 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C . A continuación se trataron las células con $200\ \mu\text{l}$ de proteinasa K (a 20 mg/ml) y $200\ \mu\text{l}$ de RNasa
- 30 (ambas a 10 mg/ml), se mezcló y se incubó durante una hora a 65°C . Finalmente, se trataron las células con 2 ml de SDS al 10% y se incubaron durante 15 minutos a 65°C . Se añadieron 12 ml de fenol/cloroformo y se repitió la extracción hasta que la fase acuosa se pudo separar con facilidad de la interfase. Se precipitó el ADN genómico con isopropanol y se resuspendió en Tris-HCl a 10 mM y EDTA a 1 mM (pH 8). El ADN genómico se digirió entonces con enzimas de restricción y se ligó con el pSP72 que estaba digerido con las mismas enzimas y tratado con fosfatasa alcalina. La
- 35 digestión del ADN genómico de *B. bifidum* se realizó con *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *SmaI* y *KpnI*. Se utilizaron mezclas de ligación para transformar la cepa DH5a de *E. coli* y se identificaron los clones positivos para la β -galactosidasa como colonias azules en las placas que contenían X-Gal.

Preparación del ADN del vector

- El vector utilizado para la clonación y la expresión durante este estudio fue pSP72 (Promega, GRB) (Krieg, P. A. y
- 40 Melton, D. A. (1987). «In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase». *Methods in Enzymology*, **155**: 397-415).

- Se eligió este vector debido a que no es capaz de complementar por carecer del fragmento α de la β -galactosidasa que no está codificado en pSP72. Este vector no lleva el segmento corto de ADN de *E. coli* que contiene la secuencia reguladora y la información codificante de los primeros 146 aminoácidos de la β -galactosidasa, que en combinación con las cepas de *E. coli* (a saber, DH5a) que expresan la porción del extremo carboxilo de esta β -galactosidasa, da una β -
- 45 galactosidasa activa (complementación α).

- El vector se digirió con las enzimas de restricción siguientes: *PstI*, *BamHI*, *HindIII*, *SmaI*, *KpnI* y *EcoRI* de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un exceso de diez veces de la enzima sobre el ADN (unidades enzimáticas: microgramos de ADN iguales a diez unidades de enzima por $1\ \mu\text{g}$ de ADN plasmídico o diez unidades enzimáticas por $0,5\ \text{pmol}$ de ADN plasmídico). Después de la inactivación térmica de la enzima (20 min a 65°C), se analizaron los
- 50 patrones de restricción mediante un análisis de electroforesis en gel horizontal. La presencia de un solo fragmento en el gel indicó que la digestión del vector era completa y que había un único sitio de restricción en él.

También se analizó que la digestión del vector era suficiente mediante la transformación de las moléculas sin ligar en

células competentes DH5a de *E. coli*. El número de colonias formadas en las placas de agar LB complementadas con ampicilina (100 µg/ml) fue un indicador de las moléculas sin digerir y del ruido de fondo esperado durante los posteriores experimentos.

Los vectores se desfosforilaron posteriormente con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, por su nombre en inglés) (Promega, Southampton, GRB) según las instrucciones del fabricante. Se comprobó la eficacia del tratamiento mediante autoligación (con la ADN ligasa del bacteriófago T4 según las instrucciones del fabricante) y la posterior transformación en células DH5a. El número de colonias formadas mostró el número de moléculas recircularizadas (vector sin clonar) y una resta de lo anterior con las colonias formadas sin el tratamiento del vector con CIAP mostró el número de vectores sin desfosforilar.

10 Construcción de la genoteca de ADN genómico

El ADN genómico se digirió parcialmente con seis enzimas de restricción que reconocen secuencias de hexanucleótidos que aparecen con frecuencia en del ADN procariota. *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *KpnI*, *SmaI* y *HindIII* son endonucleasas de restricción de tipo II que reconocen específicamente las secuencias 5'G/AATTC3', 5'G/GATCC3', 5'CTGCA/G3', 5'GGTAC/C3' 5'CCC/GGG3' y 5'A/AGCTT3' respectivamente, y rompen la doble cadena dentro de estas secuencias, lo que genera extremos 5'-protuberantes de cuatro nucleótidos, AATT, GATC y AGCT para *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII*, respectivamente, y extremos 3'-protuberantes ACGT y GTAC para *PstI* y *KpnI*, respectivamente, y extremos romos para *SmaI*.

Todas estas enzimas eran activas y capaces de escindir el ADN sólo en presencia de iones divalentes de magnesio. Estos iones eran el único cofactor requerido.

20 Digestión del ADN mediante restricción

Todas las digestiones de restricción de las muestras de ADN genómico se incubaron durante 2 horas a 37°C y finalmente se inactivaron por calor a 65°C durante 20 minutos. A continuación, las reacciones se enfriaron a temperatura ambiente y se añadió la cantidad adecuada del tampón de carga, y después se mezcló con suavidad con un capilar de vidrio sellado. Las soluciones se cargaron entonces en los pocillos de un gel de agarosa al 0,8% (se le suministra una potencia de 4 a 5 V/cm durante 14 a 16 horas) y se estimó el tamaño del ADN digerido comparándolo con el de estándar de ADN de 1 kpb (Promega, GRB) (Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [2002]).

Purificación de los fragmentos generados después de la digestión de restricción

La purificación de los fragmentos a partir de las mezclas de reacción en los geles de agarosa se realizó con el kit de extracción en gel QIAEX de Qiagen (West Sussex, GRB). Los protocolos se describen con detalle en el manual del fabricante.

Ligación y transformación del ADN

Después de la purificación de los fragmentos de ADN con el kit de extracción en gel QIAEX, se ligaron con el vector pSP72 tratado con CIAP. Para la ligación, se transfirieron las cantidades adecuadas de ADN a tubos de microcentrífuga de 0,5 ml tal y como se muestra en la tabla 1.

Tubo	ADN
A	Vector (15 fmol ~ 29,7 ng)
B	Vector (15 fmol ~ 29,7 ng de ADN) más inserto (inserto: 15 fmol ~ 69,3 ng)
C	Control de pUC (0,056 fmol ~ 100 pg)
La proporción molar entre el vector de ADN plasmídico y el fragmento de ADN de inserto debe ser ~1:1 en la reacción de ligación. La concentración final de ADN debe ser ~10 ng/µl.	

Tabla 1: Mezclas de ligación. El tubo A ilustra el número de moléculas de vector autoligado, que se debe sustraer del número total de transformantes después de la transformación. El tubo B muestra la ligación del vector con los fragmentos de ADN y el tubo C muestra el control con el que se calcula la eficiencia de la transformación.

Antes de cada ligación, se calentaron los fragmentos de ADN a 45°C durante 5 minutos para separar cualquier extremo cohesivo que se hubiera rehibridado durante la preparación del fragmento. Se eligió una proporción molar de ADN vector:inserto de 1:1 para todas las reacciones de ligación y se ensambló la reacción de acuerdo con las instrucciones de Promega.

A los tubos A y B se les añadieron 1,0 µl del tampón de ligación a 10x y 0,5 unidades Weiss de la ADN ligasa del fago T4 (Promega, GRB), y se ajustó el volumen de ligación a 10 µl con agua de calidad para biología molecular. A los tubos

C se les añadió 1,0 µl del tampón de ligación a 10 x y se ajustó el volumen de ligación a 10 µl con agua de calidad para biología molecular.

Se añadieron los fragmentos de ADN a los tubos junto con el agua y luego se calentaron a 45°C durante 5 minutos para separar cualquier extremo cohesivo que se hubiera rehibridado durante la preparación. Se enfrió el ADN a 0°C antes de que se le añadieran los restantes reactivos de ligación y se incubaron las mezclas de reacción durante una noche a 16°C (Sambrook y Russell, 2001).

Después de la precipitación con etanol y la purificación de los fragmentos ligados (para retirar la mezcla de ligación que ocasiona la reducción de la eficiencia de transformación), se realizaron las transformaciones de acuerdo con las instrucciones de Hanahan. Se añadieron aproximadamente 50 ng de ADN ligado en 5 µl de disolución a 100 µl de células competentes DH5a de *E. coli*. Después del choque térmico y la expresión del gen de resistencia a la ampicilina, se sembraron las células en la superficie de placas de LB con ampicilina (100 µg/ml), X-β-Gal (40 µl de X-β-Gal al 2%) e IPTG (7 µl de IPTG al 20%).

Se midió el número de transformantes de cada reacción de ligación. El número de transformantes que se solían obtener en el tubo C iba de 2×10^5 a 1×10^6 ufc/µg, mientras que del tubo A iba de 500 a 600 ufc/µg. El número de transformantes del tubo A era una indicación del tratamiento eficaz del ADN del vector. El número de transformantes del tubo B se encontraba en el intervalo de $2-4 \times 10^4$ ufc/µg.

Número de transformantes

Las mezclas de ligación con ADN cromosómico digerido con *Pst*I dieron lugar a 13 clones positivos de β-galactosidasa entre ~2500 transformantes cribados, mientras que con *Bam*HI dieron lugar a 7 clones positivos (~1500 transformantes cribados), *Eco*RI dio lugar a 3 clones positivos (~1300 transformantes cribados), *Kpn*II dio lugar a 7 clones positivos (~2000 transformantes cribados), *Sma*I dio lugar a 3 clones positivos (~1600 transformantes cribados) y *Hind*III dio lugar a 2 clones positivos (~1200 transformantes cribados).

Digestión de los clones positivos

Para identificar los diferentes genes de β-galactosidasa, los plásmidos aislados de los clones positivos se digirieron según la tabla siguiente.

	Muestras	Enzimas
1.ª digestión	pB1, pB2, pB3, pB4, pB5, pB6, pB7	<i>Bam</i> HI
2.ª digestión	pP1, pP2, pP3, pP4, pP5, pP6, pP7, pP8, pP9, pP10, pP11	<i>Pst</i> I
3.ª digestión	pP12, pP13, pP14	<i>Pst</i> I
4.ª digestión	pE1, pE2, pE3	<i>Eco</i> RI
5.ª digestión	pP1, pP12, pB1, pP2, pE1, pE2, pE3...	<i>Pst</i> I y <i>Eco</i> RI
6.ª digestión	pS1, pS2, pS3	<i>Sma</i> I
7.ª digestión	pP1, pP12, pB1, pP2, pS1, pS2, pS3	<i>Pst</i> I y <i>Sma</i> I
8.ª digestión	pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>Kpn</i> II
9.ª digestión	pP1, pP12, pB1, pP2, pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>Pst</i> I y <i>Kpn</i> II

La primera letra (p) indica el plásmido y el gen del inserto, mientras que la segunda letra (P, B, E, S, K) indica la enzima de restricción que se utilizó para aislar el clon correspondiente a partir del ADN genómico.

El análisis de electroforesis en gel de los fragmentos generados después de la digestión demostró que los plásmidos pB1, pP1, pP2 y pP11 tienen un inserto que codifica una β-galactosidasa diferente. Los clones que contienen pB1 se utilizaron para el análisis posterior.

30 Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN se realizó con el método de terminación de cadenas con didesoxinucleótidos de Sanger utilizando el kit de secuenciación por ciclación BigDye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems, EE.UU.) y se analizó con el ABI Prism 3100, un sistema de análisis de ADN basado en la fluorescencia que incorpora una electroforesis capilar.

Los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ADN insertados se secuenciaron con cebadores específicos del vector. Los insertos se secuenciaron además utilizando el Genome Priming System (GPS-1) (New England Biolabs, GRB). El GPS-1 es un sistema in vitro basado en el transposón Tn7 que utiliza una transposasa TnsABC para insertar el transposón aleatoriamente en el ADN diana. Se utilizó la proporción en masa de ADN donante:diana de 1:4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El número de plásmidos aislados para la secuenciación después de la inserción del

Transprimer en el plásmido diana fue 25. Se calculó este número según las instrucciones del fabricante y suponiendo una cobertura con una profundidad de 5 veces.

Para el plásmido pB1, la introducción de un inserto del transposón de ~1699 pb en la posición 973 pb cadena abajo del sitio de clonación múltiple del vector utilizado eliminó por completo la actividad de la β-galactosidasa, lo que indicaba que el codón de inicio estaba colocado entre el MCS (sitio de clonación múltiple) del vector y el sitio del transposón, mientras que la introducción del inserto en la posición 841 pb cadena abajo del MCS condujo a la formación de una β-galactosidasa activa, lo que indicaba que el codón de inicio se encontraba entre 841 pb y el 973 pb cadena abajo del MCS. La actividad de la enzima se eliminó por completo con la introducción del inserto en la posición 3565 pb cadena abajo del MCS, lo que indicaba que el codón de parada estaba cadena abajo de esta posición. Además, las inserciones en las posiciones 1239 pb, 1549 pb, 1683 pb, 1832 pb, 2108 pb, 2189 pb, 2270 pb, 2340 pb, 2414 pb, 2574 pb, 2648 pb, 2734 pb, 2807 pb y 3410 pb eliminaron por completo la actividad enzimática.

La mezcla de reacción de la secuenciación contenía aproximadamente de 400 a 600 ng de DNA plasmídico, 3,2 pmol de solución con cebador y 4 μl de la solución de BigDye Terminator.

Identificación del marco abierto de lectura

El marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de B1 se localizó con el buscador de ORF del NCBI. Se utilizó el código genético bacteriano y se determinó que la longitud del marco era de 100 pb. Se tradujo la secuencia nucleotídica en los seis marcos posibles y se identificó un marco abierto de lectura de 1052 aminoácidos que codifica una posible β-galactosidasa (la traducción se muestra en la figura 2).

Ejemplo 2

Síntesis con la enzima β-galactosidasa clonada que se aisló de *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 en el hospedador *E. coli* (cepa DH5a)

La siguiente síntesis descrita, a menos que se mencione otra cosa, se realizó con las células hospedadoras DH5a de *E. coli* enteras después del tratamiento de la biomasa de *E. coli* (recogida por centrifugación a 10 000 g) con tolueno a una concentración de 2000 ppm para aumentar la permeabilidad celular y también para convertir las células en inviables al destruir su membrana citoplásmica. Se preparó la biomasa de *E. coli* como se describió en el ejemplo 1 en «Cepas de *E. coli*».

Síntesis con la enzima clonada

Se realizó la síntesis con β-galactosidasa a una concentración de sustrato que era una concentración inicial de lactosa al 40% (p/p). Se preparó la solución de síntesis en tampón de fosfato a 0,1 M a pH 6,8 (o tampón de citrato a 0,1 M, pH 6,2, o tampón de fosfato de potasio, pH 6,8). Se realizó la síntesis a 40°C en un baño de agua con agitación a 150 rpm. Se eligió el pH óptimo para la enzima específica según las mediciones de actividad (utilizando o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido como sustrato) de una preparación enzimática específica a diferentes valores de pH.

Para la síntesis del galactooligosacárido, se centrifugaron (a 10 000 g) 5 ml de una suspensión de células DH5a de *E. coli* (con una actividad de 2,2 U/ml) para recoger la biomasa y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió esta biomasa con 10 g de la solución de sustrato al 40% (p/p) para realizar la síntesis.

Las concentraciones de los diferentes azúcares presentes en la mezcla durante la síntesis se muestran en la figura 3. Los cromatogramas de HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a la detección amperométrica pulsante) de las mezclas de galactooligosacáridos sintetizados por la β-galactosidasa clonada de *B. bifidum* NCIMB 41171 se muestran en la figura 4. La concentración de los azúcares de la mezcla de galactooligosacáridos en el punto de tiempo óptimo de la síntesis se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de glúcidos de la síntesis de galactooligosacáridos con una concentración inicial de lactosa al 40% (p/p) en el punto de tiempo donde se observó una concentración máxima de oligosacáridos.

Sustrato inicial para la síntesis	GP GOS ≥ 3	GP GOS = 2	Lac	Glc	Gal
% (p/p)	Concentración (% de azúcares totales)				
40	20,45	27,64	12,73	25,90	13,28

Lac: lactosa, Glc: glucosa, Gal: galactosa, GP: grado de polimerización 5

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> LINDSAY, Clare L
 <120> Producto y procedimiento
 <130> 13906WO: GH
 5 <150> GB 0601901.2
 <151> 2006-01-31
 <160> 2
 <170> PatentIn, versión 3.4
 <210> 1
 10 <211> 7281
 <212> ADN
 <213> *Bifidobacterium bifidum*
 <220>
 <221> gen
 15 <222> (1).. (7281)
 <400> 1

```

ggatccgggtg aacgcgcccga gcgcggtgta cgtgctgctc tcgtgctgagtg cggaggagat      60
cgcgggggatc atgccccagt aggagatgtc gcgcagcag tagatcacgt cgagcaggat      120
gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccgggtgttc acatccacga ggccgaacag      180
gccgggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg      240
gcggaaccgg ccccagcggg tgttcgtggt gtccacgagg ttgccgagca gcgggtcagag      300
aaagatctcc gcgatgcgga tgaccaccac gagtccgggtg atcaccgcga tgaggcgttt      360
ggcaagcgtc ttgtccacgt cgatgaacag cgcggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt      420
gctcattgtg ttgtagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgtatg cgatcttctg      480
accctgtgtc cgcgtgggct gcggccttcc ggctcgttcc gtgtgtttgtg tgggtggatcc      540
gctcatggtg tgggtggcctc cttgcgacct gtaaagaatc cgtgctgctg aaccgctccg      600
atcccgcaa gcggtgagtat agaactttct tgaaaaagta gaaaactata ccgctgctcg      660
caaatcatgc caacgttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt ttgaagcctg      720
cttgatgtgc ttgaatctta agaaatccac gtattctgca tgttgaggc cttgtgcccgc      780
gaaatgctgg aaagaatttg cgcaatcaag taacaatatt taccctgtt gtacaaggaa      840
cccgattcaa cgaggttccc tactgctggc ggcaacgacg cgacgcaatc cgatgctgaaa      900
gcgaggacat catgaacaca accgacgatc agcgggaagaa cggcgatccg atcgtctccc      960
cgtccatacc gacgacggca tggctcggcg acccgcgctg gtacgctggt caccggctcg      1020
acgcccattc cgatcatgct tgctggtctc gctccccagt cgacggcgag agcacgaatc      1080
tcaggcagag ccttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcgccg acgggcccgtt      1140
tccccgatgg gacgagcgc gggccggact ggatcagcga cgtgctgcct ctgttcgccc      1200
cgcccggatt cgacgattcg tcgttctcac gcgtgcaggt gccctcgcac ctggagactg      1260

```

cggggctgct	tgccccgag	tacgtgaacg	tgagtagacc	atgggacgga	catgaggacc	1320
cgaaggcccc	ggccatcccc	gagcatggcc	atgtggcggg	ctaccggcgc	gagttcgacg	1380
cggatggcga	agtcgcccag	gccgtgcgcg	aagggcgccc	ggtgacgctt	accttccagg	1440
gcggggccc	agccatctac	gtgtggctca	acggctcgtt	cgttggctac	gccgaggact	1500
ccttcacgcc	cagcgagttc	gacgtgacgg	acgcgatcaa	ggtggacggc	aacgtgctgg	1560
cggtcgtctg	ctacgagtat	tcgagcgcga	gctgggtgga	ggatcaggac	ttctggcgtc	1620
tgcacggcct	gttcgctcc	gtcgaactca	acgcgaggcc	cgccgcccac	atcgccgacc	1680
tccatgccga	cgccgactgg	gatctcgcca	catcaagggg	ttcgctctcg	ctggatgtgc	1740
tgatcgacgg	tgccgcgaac	gccgcgacgg	tcgacttcgc	actgtgggac	aagaacggca	1800
ccatcgtctg	gcacaccgcc	acgaaagcgg	acggaacgct	gcacgccgag	gccgagatcg	1860
atgacgcggc	gccatggagc	gccgaacgcc	ccgacctgta	cgagctatcc	gtcaccctgc	1920
tcgacgcgga	cggcaaggtc	ctggagaccg	ctcgactcgc	catcggcttc	cggcatgtgg	1980
ccatcgagga	cggcatcctc	aagctcaacg	gcaagcgctt	cgtgttccgt	ggcgtcaacc	2040
gccacgagtt	cgactgccgg	cgcgccgggg	ccatcaccga	agaggacatg	ctgtgggaca	2100
tccgcttcat	gaagcgccac	aacatcaacg	cgggtgcgac	ctcgactat	ccgaaccagt	2160
cgcgctggta	cgagctgtgc	gacgaatacg	gcatctacct	gatcgacgag	accaatctgg	2220
agacctatgg	cagctggaac	agccccggcg	acatccccgt	gggaacctcc	gtccccggtg	2280
acgacgaggc	ctggctgggc	gcgtgcatcg	accggctgga	cagcatgata	ctgcgcgacc	2340
gcaaccatcc	cagcgtgctc	gtctggtcgc	tgggcaacga	atcctacgcg	ggcgaagtcc	2400
tcaaggccat	gagcgcgcac	gcgaccgggc	ttgatccggg	tcgtcccgtc	cactacgaag	2460
gtgtcaactg	gaaccatgcc	tacgacggga	tcagcgactt	cgaaagccgt	atgtacgcca	2520
agccggccga	gatccaagac	tggtcgaac	acggcgacga	acggggcgag	gagcaagc	2580
cgttcgtcag	ctgtgagtac	atgcatgcca	tgggcaactc	gtgcggcggg	ctgagcgagt	2640
tcacgcacct	cgaacggtag	gagcgtact	ccggcggggt	catctgggat	tacatcgacc	2700
aggggctcgt	ccagcgtctg	cccgacggga	gcaacgcctt	cagcgtcggc	ggagaatggg	2760
gcgaccgtcc	aaccgactac	gaattcgtgg	gcaacggcat	cgtgttcgcc	gaccgcacgc	2820
ccagcccaaa	ggcgcaggag	gtcaagcagc	tgtattcgcc	ggtcaagctc	gccccgacg	2880
ggcacggcgt	gaccatcgag	aaccgcaacc	tggtcggcgg	caccgacggc	tacgtgttcg	2940
ccgcacggct	cctcgaagac	gggcatgaga	tctggcatgc	cgactaccgt	ttcgacgtgg	3000
ccgcaggaga	taccaaacac	catgacatcg	ccttcccggg	catcgacgcg	gacggggata	3060
cgcgcaagt	cacctacgag	gtcgatctcc	tgctcgccga	agccaccgca	tggcgccgg	3120
ccggctacga	gctcgcgttc	ggccaactca	ccggcacgct	caaccggaa	caggacatca	3180
ccgagaccag	ccatgacgac	gacggccgcg	caactcgac	gctcagccga	tggaacgccg	3240
gcatccgccg	cgacgacgag	gaaattctcc	tgtcacgcac	tcagggaggc	atcgtctcct	3300

ggaagcgcga cgaccgggaa atggtcatcc gtcgccccga actcgtcacg ttccgcccatt 3360
 tgaccgacaa cgatcgcggt aaccattccg gtttcgaccg tgccgcatgg ttccgggccg 3420
 gccgatacgc catcgttaacc gaaacgaaaa tccatgaaag cgatgacggt ctcgtagcgg 3480
 aataccagta cgaacttgcc gatccgaacc acacgcccgt gtccgtcact taccatgtca 3540
 actccgatat gcgtatgcaa ctgaccgtcg aataccccgg gaacgccact gacatggcca 3600
 gtctgccccg gttcggatc gaatgggagc tgcccggcga atacgatcgt ctgcgtact 3660
 acggccccgg ccccaggag acctaccg accgtaagca gggcggcaag ctcggcatct 3720
 gggacgccac cgcaaggcg agcatggcg cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc 3780
 acgaggacgt ccgctggctc gaagccaccg acatccaagg ccacggattg cgcgtcacc 3840
 aacgcggcga ccgtcactc acggccagcc tgctgcctg gaacacctac acgatcagg 3900
 ccgcgcgccg ccacaggac ctgcccacaac cgcgccaca ctacctgcg ctgctcggg 3960
 cccagatggg cgtcggtgga gacgactcct ggggagccc cgtccacacg gcctaccagc 4020
 tgcccgccgg caggccgctc accctcgacg tgaacctcga actcatctga ccggcaacgg 4080
 gcggcggcat gcaccaccat gccgcgccg gccccgccta cgacgcggcg atcgaggcca 4140
 cgggcgctgc ggccgcggac ggcaccggcg aggaggcgtt cgagcgcgcc ggccacgcgg 4200
 tccacggcac caccgcccag gtcctctcgc tcatcacaa cccgatggac gtgatctgcc 4260
 gcaacatccg caccgtgcg gagaagatgg caaccgccc cgacatcctc ggctgccacc 4320
 tcgaaggccc gttcctcgc ctcaagtga agggcgcga cgattcgaac tgcctcaaag 4380
 acccgatgcc cgaactcatg gaccgatgc tcgacgcctc gggcgcggac ctcgcccgg 4440
 gcaagctcgg gtgcatccgc cagatcacca tctcgacccc accgactgga ccgcccaca 4500
 cgtctggtgc gccggccgcc aggtggagta aactccttc agcaaatcg acgcccgtgc 4560
 cgcccgtctc gagacgacgt cttagcctg aggaacgaag cttgcgcgcg gcaccagttc 4620
 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcaccg ccgctcatgc ttcaaccat cgatcaggg 4680
 ggagaacgcc atgccccca actccccttg atcgatcga tacgaactca gcggcggcga 4740
 cgtgtaccgg gcgatcgact ggtgttcac actcaccacg gccaactcgt cgggaacctc 4800
 cacgcgcagt gcgttcaacg cctgcaacgc ccccaccgca agcacgtcgg cggccacgat 4860
 caaacatcg ggcatgctgc cggcctcag atggtcagcc accaactgct ccgagagacg 4920
 atagccgttc tccacgggta acgtgcccga cgaatacacc aatccgtccg tttccaatcc 4980
 cagatgcgcg gccactgac ggaacgacag ctcgcgaatg tcctcgggat agtcatgat 5040
 gcccatgat ctgcccacgc cggcgagaaa cgcgatatga ctgcccggc cgcgatcat 5100
 cgcgtccaag gcgtccagca tcgtctgca cagatcggga cacacggagt cgaacaggcg 5160
 cggcggcga ttcgtgtcga tgacacgcc atgcccggag accatattga gggctcgcag 5220
 gtccgcttcg gaaacaccg tggctcccac ggtgatgaac ccatcaact ccggtgcgcg 5280
 ttccgtcaac tcgtgatgg acaacgtgag ctggtccaat tccaacgact ccgcacgctc 5340

```

cgcaagaacc ttccgcagat cggcgaagta cgcgtcctgc aattcctccc cggacggagg 5400
cgcatccaac accgcgatcg ggggacggaa cacgttgca taccatct cctcgcacac 5460
gcgcaacaca cgccgacgcg tctcctcctt gatggagaac gacgggtcgt tcaacaagcg 5520
tgacaccgtg ctctgcgaca ccccgccccg tcccgcgact tccttgagcg tggccatgac 5580
atcctccccg caaactttag taaagggttt tactacagca taaccggga aggcggggtt 5640
agcggcattg gcggcgtgga agtttacca tgactggtag actgcacatg tcccggaat 5700
aggggcaatg catagggggg tggcgggcat gtgcagcaac attcccgta cttacgatt 5760
cttatacggt gtcaggtaaa agaattatga ttctcaatcc accttccggc cgcgctgca 5820
gactcaaatg gccatgatgc atagcgacaa tctctcgac tatggataaa cccaatccgt 5880
gatgaggtga tgcagatccc acatgcgat ttatcctatt atcctcccct ctgttaaag 5940
gtgacaggaa atcatctatc ctctgatcgg aaagatccat gccggtattg gatatgtcta 6000
tcgcaatgca ggactcgcct tcgtattgcc tgcgttggc taagttatc catacatgtg 6060
gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tcgtaataag gtttgaatc atctgtctaa 6120
ttagcagacc atcggctagg atatatgcat tctccagatt ggtatgtact tgaactctat 6180
ctccgataag ttccatattt tcctgaagaa cattgcgaat gatctcagct acattaactc 6240
ggctaagatc agctcggttt aattgctgaa ctttcgacaa ttcgagcaga tgattgacga 6300
tttcaacccc agcatgattt gaagccaaag ctttttcgac gaaaggctcg caacgctcat 6360
cgaaaagctg gttgtgcagc ggaatctcca atgcggccga agtggccgca agtggatttt 6420
ttaactcatg tgacgcatcg gcgataaatt ctttttcccg actgattgcg ctggtgagat 6480
cttttaacat gaggttgtat gcggatgcaa tagtgtacgc ctctcgttt tcatatggaa 6540
taacgatagg ttgcctttcc aatccagcgt cggacgcgat aatctgagag gccacactat 6600
tgattcttcg ttgtgtccta gtggcgataa tccaagttat tcctccagat aatatgccga 6660
aaacaatgat gggggctatg cttaccgcca atatcagatc ccgggatttt atgtctcctt 6720
gttccatagt tagcgttaaa gcaccttac cggagtcata cccggcagaa acgtaatcct 6780
taccggagtc aggaggaatg gcttgcgaat tcaaactatg ttgttcatcg gcaccttctg 6840
cctgagtaaa agatttatct acggctactg tttccagttg ccggttcacg acataatag 6900
tcatggcggg caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc 6960
ttcttctgt agaccactga aacggtaaac gcagtttcgg atggctggaa tggctcccat 7020
tcgacgaagg atattcaggc ttttcatga tatgcgatat cctgttccgg gaacggtttc 7080
aatgaaatca gtgattccga ttttcgtgag aatcgcgatg attgtggtct tgacgattcc 7140
tctcgtatga gcgtgatcat cctgccaat ctacgatag agacattccg cactaatcac 7200
cgcacctcgc gcctcaatca gcgtcctcaa tacggcaagt tctcgtttcc caaactttag 7260
ttctgcaccg cgaaccgtga t 7281

```

<210> 2

<211> 1052

<212> PRT

5 <213> *Bifidobacterium bifidum*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1) .. (1052)

<400> 2

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

500					505					510					
Val	His	Tyr	Glu	Gly	Val	Asn	Trp	Asn	His	Ala	Tyr	Asp	Gly	Ile	Ser
		515					520					525			
Asp	Phe	Glu	Ser	Arg	Met	Tyr	Ala	Lys	Pro	Ala	Glu	Ile	Gln	Asp	Trp
	530					535					540				
Leu	Glu	His	Gly	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ala	Ser	Lys	Pro	Phe	Val	Ser
545					550					555					560
Cys	Glu	Tyr	Met	His	Ala	Met	Gly	Asn	Ser	Cys	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu
				565					570					575	
Phe	Ile	Asp	Leu	Glu	Arg	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Gly	Gly	Phe	Phe	Trp
			580					585					590		
Asp	Tyr	Ile	Gly	Gln	Gly	Leu	Val	Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu
		595					600					605			
Arg	Leu	Ser	Val	Gly	Gly	Glu	Trp	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Asp	Tyr	Glu
	610					615					620				
Phe	Glu	Gly	Asn	Gly	Ile	Val	Phe	Ala	Asp	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Lys
625					630					635					640
Ala	Gln	Glu	Val	Lys	Gln	Leu	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Leu	Ala	Pro	Asp
				645					650					655	
Gly	His	Gly	Val	Thr	Ile	Glu	Asn	Arg	Asn	Leu	Phe	Ala	Gly	Thr	Asp
			660					665					670		
Gly	Tyr	Val	Phe	Ala	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	His	Glu	Ile	Trp
		675					680					685			
His	Ala	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Val	Ala	Ala	Gly	Asp	Thr	Gln	His	His
	690					695					700				
Asp	Ile	Ala	Phe	Pro	Asp	Ile	Asp	Ala	Asp	Gly	Asp	Thr	Arg	Glu	Val
705					710					715					720
Thr	Tyr	Glu	Val	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Thr	Ala	Trp	Ala	Pro
				725					730					735	
Ala	Gly	Tyr	Glu	Leu	Ala	Phe	Gly	Gln	Leu	Thr	Gly	Thr	Leu	Asn	Pro
			740					745					750		
Glu	Gln	Asp	Ile	Thr	Glu	Thr	Ser	His	Asp	Asp	Asp	Gly	Arg	Ala	Thr
		755					760					765			
Arg	Thr	Leu	Ser	Arg	Trp	Asn	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Asp	Glu	Glu

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de ADN que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos como la ofrecida en la SEQ ID n.º 2.
2. Secuencia de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia se ofrece en la SEQ ID n.º 1.
3. Enzima codificada por una secuencia de ADN según la reivindicación 1 o según la reivindicación 2.
- 5 4. Enzima que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID n.º 2.
5. β -Galactosidasa que tiene la secuencia que se define en la SEQ ID n.º 2.
6. Vector recombinante que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 1 o según la reivindicación 2.
7. Vector de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho vector es un vector de expresión.
8. Célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 1 o según la reivindicación 2.
- 10 9. Célula hospedadora que comprende el vector según la reivindicación 6 o según la reivindicación 7.
10. Célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 8 o con la reivindicación 9, en la que dicha célula es una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula de hongo.
11. Célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Bacillus* y *Aspergillus*.
- 15 12. Célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la célula se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circularis* y *Aspergillus niger*.
13. Utilización de una enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para producir una mezcla de oligosacáridos.
14. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la mezcla comprende los disacáridos Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal y Gal (α 1-6) Gal.
- 20 15. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13 o con la reivindicación 14, en la que la mezcla comprende trisacáridos Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, tetrasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, y pentasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc.
16. Utilización de una enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para producir una mezcla de oligosacáridos que son parte de un producto seleccionado entre el grupo que consiste en productos lácteos, tales como leche líquida, leche en polvo seco, leches infantiles, fórmulas para bebés, helado, yogur, queso, productos lácteos fermentados, bebidas tales como zumo de fruta, comidas infantiles, cereales, pan, galletas, golosinas, pasteles, complementos alimenticios, complementos dietéticos, productos comestibles probióticos, productos comestibles prebióticos, comidas para animales, comidas para aves de corral y medicamentos.
- 25 17. Utilización de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la mezcla comprende disacáridos Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal y Gal (α 1-6) Gal, trisacáridos Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, tetrasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc y pentasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc.
18. Utilización de una célula hospedadora según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para producir un producto seleccionado entre el grupo que consiste en productos lácteos, tales como leche líquida, leche en polvo seco, leches infantiles, fórmulas para bebés, helado, yogur, queso, productos lácteos fermentados, bebidas tales como zumo de fruta, comidas infantiles, cereales, pan, galletas, golosinas, pasteles, complementos alimenticios, complementos dietéticos, productos comestibles probióticos, productos comestibles prebióticos, comidas para animales, comidas para aves de corral y medicamentos.
- 35 19. Procedimiento para producir una enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende el cultivo de una célula hospedadora según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de dicha enzima y la recuperación de la enzima resultante a partir del cultivo.
20. Procedimiento para producir una mezcla de oligosacáridos que comprende disacáridos Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal y Gal (α 1-6) Gal, trisacáridos Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc, tetrasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc y pentasacárido Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o una célula hospedadora según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 con un material que contiene lactosa.
- 45

Figura 1

1 ggatccggtg aacgcgccga gcgcggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat
 61 cgcggggatc atgccccagt aggagatgtc gcgcagcgag tagatcacgt cgagcaggat
 121 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccggtgttc acatccacga ggccgaacag
 181 gccggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg
 241 gcggaaccgg ccccagcggg tgttcgtgtt gtccacgagg ttgccgagca gcgggtcgag
 301 aaagatctcc gcgatcgga tgaccaccac gagtccggtg atcaccgca tgaggcgttt
 361 ggcaagcgtc ttgtccacgt cgatgaacag cgcggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt
 421 gtcattgtg tttagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgtatg cगतctctg
 481 acccgtgtc cgcgtgggct gcggccttc ggtcgttcc gtgtgtgtg tggggatcc
 541 gtcctggtg tggggcctc cttgcgacct gtaaagaate cgtgcgctg aaccgctccg
 601 atcccgaaa gcgtgagtat agaacttct tgaaaaagta gaaactata ccgcgtgctg
 661 caaatcatc caacttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt ttgaagcctg
 721 cttgatgtc tgaatctta agaaatccac gtattctgca tgttcaggc cttgtgccg
 781 gaaatgctg aaagaattg cgaatcaag taacaatatt tatcctgtt gtacaaggaa
 841 cccgattcaa cgagggtccc tcactcggc ggcaacgacg cgacgaate cगतcgaaa
 901 gcgaggacat catgaacaca accgacgac agcgggaagaa cggcgatcc atcgtctccc
 961 cgtccatacc gacgacggca tggctcggc acccgcgct gtacgggtt caccggctg
 1021 acgccattc cगतcatgcg tctgtgtc gtcctccagt cgacggcgag agcacgaate
 1081 tcaggcagag cttgacggc gaatggcggg tccgcctga gacggcggc acggggcctg
 1141 tccccgatg gacgagcgac gggccggact gगतcagca cgtgtgctt ctttcggc
 1201 cgccccgatt cgacgattc tcttctac gcgtgcaggt gccctgcat ctggagactg
 1261 cggggtgct tcccccgag tacgtgaac tgcagtacc atgggacgga catgaggacc
 1321 cgaaggcccc ggccatccc gagcatggc atgtggcgg ctaccggcg gagtgcgac
 1381 cगतggcgga agtcgccag gccgtgcgc aaggggccc ggtgacgtt acctccagg
 1441 gcgcggccac agccatctac gtgtgctca acggctcgt cgttggtac gccgaggact
 1501 cttcacgcc cagcgagtt gacgtgacgg acgcgatcaa ggtggacggc aacgtgctg
 1561 cggctgctg ctacgagtat tcgagcgca gctggtgga gगतcaggac ttctggcgc
 1621 tgcacggcct gttcgtcc gtcgaacta acgcgaggcc cggcggccac atcggcacc
 1681 tccatgccg cggcactgg gatctgcca caaaagggg ttcgtctc ctggatgtc
 1741 tgatcgacgg tggcgaac gccgcgacgg tcgacttgc actgtgggac aagaacggca
 1801 ccatgctg gcacaccgcc acgaaagcg acggaacgt gcacggcgag gccgagatc
 1861 atgacgggc gccatggag gccgaacgcc ccgacctga cgagctatc gtcacctgc
 1921 tcgacggga cggcaaggte ctggagacc ctcgactc catcggttc cggcatgtg
 1981 ccatcgagga cggcatctc aagctcaac gcaagcgcct cgtgtccgt ggcgtcaac
 2041 gccacgagt cगतcggc gcggccggg ccataccga agaggacat cgtgggaca
 2101 tccgctcat gaagcgccac aacatcaac cggtcgcac ctgcactat ccgaaccgt
 2161 cgcgtggtg cgagctgtg gacgaatac gcatctacct gatcgacgag accaatctg
 2221 agaccatgg cagtggaa agccccggc acatccccgt gggaacctc gtcctggg
 2281 acgacgagc ctggctggg gcgtgcatc accggctgga cagcatgat ctgcgcgacc
 2341 gcaaccatc cagcgtgct gctgtgtc tgggcaacga atctacgc ggcaagtc
 2401 tcaaggccat gagcgcgcac gcgaccggc ttgatccggg tctccgct cactacgaag
 2461 gtgtcaact gaaccatgcc tacgacggga tcagcgact cgaagccgt atgtaccca
 2521 agccggccga gatcaagac tggctgaac acggcgacga acggggcgag gcgagcaagc
 2581 cgttcgtcag ctgtgagt atgcatgca tgggcaact gtgcggcgg ctgagcgagt

2641 tcatcgacct cgaacggtag gaggctact cggcggggt catctgggat tacatcgacc
 2701 aggggctcgt ccagcgtctg cccgacggga gcgaacgcct cagcgtcggc ggagaatggg
 2761 gcgacctcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcacgc
 2821 ccagcccaa ggcgaggag gtcaagcagc tgtatcgcc ggtcaagctc gccccgagc
 2881 ggcacggcgt gaccatcgag aaccgcaacc tgttcgccgg caccgacggc tacgtgttcg
 2941 ccgacggct cctcgaagac gggcatgaga tctggcatgc cgactaccgt ttcgacgtgg
 3001 ccgaggaga tacccaacac catgacatcg ccttcccga catcgacgcg gacggggata
 3061 cgcgcgaagt cacctacgag gtcgatctcc tgcctccga agccaccgca tggcgccgg
 3121 ccggctacga gctcgcgtc ggccaactca ccggcagct caacccgaa caggacatca
 3181 ccgagaccag ccatgacgac gacggcccg caactcgac gctcagccga tggaaagccg
 3241 gcatccggcg cgacgacgag gaaattctc tgcacgcac tcagggaggc atcgtctct
 3301 ggaagcgcga cgaccgggaa atggtcatcc gtcgcccga actcgtcacg ttccgccat
 3361 tgaccgaaa cgatcgggg aaccattccg gtttcgaccg tgccgatgg ttgcggccg
 3421 gccgatacgc catcgtaac gaaacgaaa tccatgaaag cgatgacggg ctctagcgg
 3481 aatacagta cgaactgcc gatccgaacc acacgccgt gtcggtact taccatgtca
 3541 actccgatat gcgtatgcaa ctgaccgtc aataccccg gaacgccact gacatggcca
 3601 gtctgcccgc gttcgtatc gaatgggagc tggcgccga atacgatct ctgcgctact
 3661 agggcccg ccccgaggag acctaccgc accgtaagca gggcgcaag ctgggatct
 3721 gggagccac cgcgaaggcg agcatggcg cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc
 3781 acgaggacgt ccgtggctc gaagccaccg acatccaagg ccacggattg cgcgtcacc
 3841 aacgcggcga ccgtcactc acggccagcc tgcgcccgt gaacacctac cgatcgagg
 3901 ccgcgcccg ccacgaggac ctgcccnaac cgcgccaaa ctacctgcg ctgctcggg
 3961 ccagatggg cgtcgggga gacgactct ggggagcccc cgtccacacg gcctaccagc
 4021 tggccggcg caggccgctc acctcgacg tgaacctga actcatctga ccggcaacgg
 4081 gcggcggcat gcaccacat gccgcccgc gcccgccta cgacggcg atcgaggcca
 4141 cggcgctgc ggccgggac ggcaccggcg agggggcgt cgagcgcgcc ggccacgcgg
 4201 tccagggcac caccgcccag gtctctcgc tcatcaciaa cccgatggac gtgatctgc
 4261 gcaacatccg caccgtcgc gagaagatgg caaccgccc cgatcctc gggtgccacc
 4321 tgaaggccc gttctcgc ctaagtga agggcgcgca cgattgaa tgcctcaag
 4381 accgatgcc cgaactcatg gaccgatgc tcgacgctc gggcgccgac ctgcccgg
 4441 gcaagctcgg gtgatccgc gatcacca tctgacccc accgactgga ccgccaaca
 4501 cgtctgggctc gccggccgc aggtggagta aactcctcc agcaaatcg acgccggtc
 4561 cgcccgtctc gagacgagc cttacgctg aggaacgaag cttgcgcg gcaccagtc
 4621 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcaccg ccgctcatgc tcaacctc cgatcgggt
 4681 ggagaacgcc atcgggcca actcccttg atcgatcga tacgaactca cggcgccga
 4741 cgtgtaccgg cgatcgact gttgttac actcaccag gccaactcgt cgggaacctc
 4801 cacgcgagc ggttcaacg cctgcaacg ccccaccgca agcagctcg cggccacgat
 4861 caaacatcg ggcagctgc cggcctcag atggtcagcc accaactgct ccgagagc
 4921 atagccgttc tccaggtga acgtcccga cgaatacacc aatccgtccg ttccaatc
 4981 agatcgcg gccactgac ggaacgacag ctgcgcaatg tctcgggat agtcatgcat
 5041 gccatgatg ctgcccacgc cggcagaaa cgcgatatga ctgcccgg ccgcatcat
 5101 cgcgtcaag gcgtccagca tctctcga cagatcggga cacacggagt cgaacaggc
 5161 cggcgccgga ttcgtctga tgcacacgc atgcccggc accatagca gggctcgcg
 5221 gtccgctc ggaaacacc tggctcccac ggtgatgaac ccatcaact ccgttcg
 5281 ttccgtcaac tctgtatgg acaactgag ctggtccaa tcaacgact ccgacgctc
 5341 cgcaagaacc ttccgatg cggcgaagta cgcgtcctc aattcctcc cggcggagg
 5401 cgcaccaac accgcatcg cgggacggaa cacgttcga taccatct cctgcacac

5461 ggcgaacaca cgccgacgcg tctcctcctt gatggagaac gacgggctgt tcaacaagcg
5521 tgacaccgtg cctcgcgaca ccccggcccg tcccgcgact tcttgagcg tggccatgac
5581 atcctccccg caaacttag taaaggggtt tactacagca taaccgggga aggcgggggt
5641 agcggcattg gcggcgtgga agttaccba tgactggtag actgcacatg tcccggcaat
5701 aggggcaatg catagggggg tggcgggcat gtgcagcaac attcccgta ccttacgatt
5761 cttatagcgt gtcaggtaaa agaattatga ttctcaatcc acctccggc cgcgctgca
5821 gactcaaatg gccatgatgc atagcgaaa tctcgcgac tatggataaa cccaatcgt
5881 gatgaggatga tgcagatccc acatgcgtat ttactctatt atcctcccct ctgtaaaag
5941 gtgacaggaa atcatctatc ctcgtatcgg aaagatccat gccggattg gatatgtca
6001 tcgcaatgca ggactcgcct tcgtattgcc tgcgttggc taagtattc catacatgtg
6061 gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tcgtaataag gtttcaatc atctgtctaa
6121 ttagcagacc atcggctagg atatatgcat tctccagatt ggtatgtact tgaactctat
6181 ctccgataag ttccatattt tctgaagaa cattgcgaat gatctcagct acattaactc
6241 ggctaagatc agctcgggtt aattgctgaa ctttcgaaa ttcgagcaga tgattgacga
6301 tttcaacccc agcatgattt gaagccaaag cttttcgac gaaaggtctg caacgctcat
6361 cgaaaagctg gttgtgcagc ggaatctcca atgcggccga agtggccgca agtggattt
6421 ttaactcatg tgacgcatcg gcgataaatt cttttcccg actgattgcg ctgttgagat
6481 cctttaacat gaggttgtat gcggatgcaa tagtgtacgc ctcgtcgtt tcatatggaa
6541 taacgatagg ttgccttcc aatccagcgt cggacgcat aatctgagag gccacactat
6601 tgattctcgc ttgtctcta gtggcgataa tccaagtat tctccagat aatatgccga
6661 aaacaatgat gggggctatg ctaccgcca atacagatc ccgggattt atgtctcct
6721 gttccatagt tagcgttaaa gcaccttac cggagcata cccggcagaa acgtaactc
6781 taccggagtc aggaggaatg gcttgcaat taaactatg ttgtcatcg gcactctc
6841 cctgagtaaa agatttattt acggtcactg ttccagtg ccggtcacg acataatg
6901 tcatggcggg caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc
6961 ttctcttgt agaccactga aacggtaaac gcagttcgg atggctggaa tggctccat
7021 tcgacgaagg atattcaggc ttttcatga tatcgatat cctgtccgg gaacggttc
7081 aatgaaatca gtgattccga tttcgtcgc aatcgcatag attgtgtct tgacgattc
7141 tctcgtatga gcgtgatcat cctgccaat ctcagatat agacattcc cactaatc
7201 cgcacctcgc gcctcaatca gcgtcctcaa tacggcaagt tctcgttcc caaacttag
7261 tctgcaccg cgaaccgtga t

Figura 2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  MNTTDDQRKNGDPIVPSIPTTAWLADPRVYAVHRLDAHSDHACWSRSPVDGESTNLRQSLDGEWRVVRVETAPTGRFPDGTSDGFOWISDVSPLFAAPGF

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
101 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   DDSFSSRVQVP SHLETAGLLAPQYVNVQYPWDGHEDPKAPAIPEHGHVAVYRREFDADGEVAQAVREGRPVTLTFQGAATAIYVWLNGSFVGYAEDSFTP

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
201 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   SEFDVTDAlKVDGNVLAVVCCYEYSASWLEDQDFWRLHGLFRSVELNARPAAHIALHADADWDLATSRGSLSLDVLIDGAANAATVDFALWDKNGTIW

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
301 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   HTATKADGTLHAAEAEIDDAAPWSAERPDLYELSVTLLDADGKVLLETARTRIGFRHVAIEDGILKLNKRLVFRGVNRHEFDCRRGRAITEEDMLWDIRFM

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
401 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   KRHNINAVRTSHYPNQRWYELCDEYGIYLI DETNLETHGSWNSPGDIPVGTSPVGDDEAWLGACIDRLDSMILDRNHPSVLVWVSLGNESYAGEVLRKAM

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
501 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   SAHAHRLDPGRPVHYEGVNNHAYDGISDFESRMYPKPAEIQDWLEHGDERGEASKPFVSC EYMHAMGNSCGGLSEFIDLERYERYSGGFIWBDYIDQGLV

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
601 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   QRLPDGSERLSVGGEGWDRPTDYE FVGNIVFADRTSPKAEVKQLYSPVKLAPDGHGVTIENRNLFASTDGYVFAARLLEDGHEIWHADYRFDVAAGD

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
701 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   TQHHDIAPFDIDADGDTREVTYEVDLLAEATAWAPAGYELAFGQLTGTLNPEQDITETSHDDDDGRATRTLSRWNAGIRRDDEEILLRTQGGIVSWKRD

      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
801 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   DREMVIIRPELVTFRPLTDNDRGNHSGFDRAAWFAAGRYAIVTETKIHESDDGLVAEYQYELADPNHTPVSVTYHVNSDMRMQLTVEYPGNATDMASLPA

      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
901 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
   FGI EWELPGEYDRLRYGPGPEETYRDRKQGGKLG IWDATAKASMAPYLMVQETGSHEDVRWLEATDIQGHGLRVTRQGRDRHFTASLLPWNTYIEARR

      1010    1020    1030    1040    1050
1001 .....|.....|.....|.....|.....|
   HEDLPKPRHNYLRLLAAQMGVGGDDSWGAPVHTAYQLPAGRPLTLDVNLELI
  
```

Figura 3

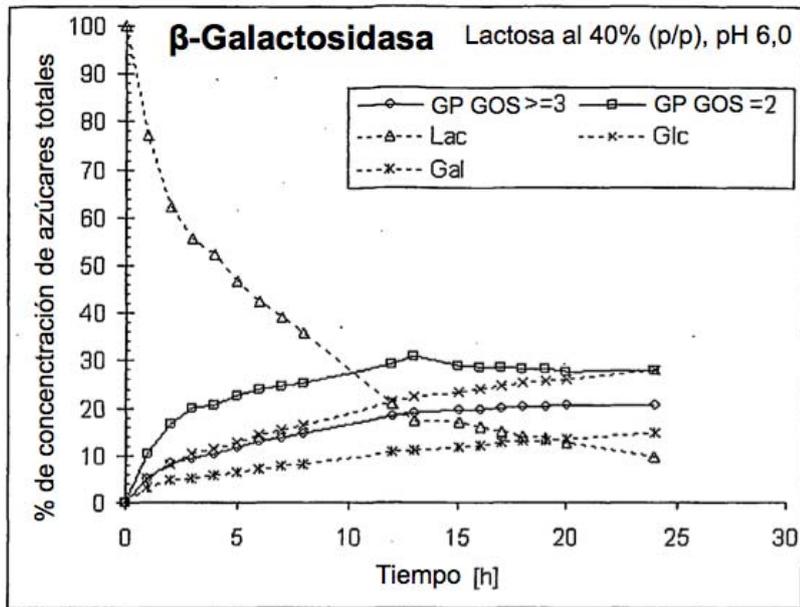


Figura 4

