



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 654**

51 Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

C12N 11/00 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04702392 .4**

96 Fecha de presentación : **15.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1599278**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **Método de producción de un éster de hidroxiaácido.**

30 Prioridad: **17.01.2003 GB 030117**
17.01.2003 GB 030118
17.01.2003 GB 030119
17.01.2003 GB 030120
17.01.2003 GB 030121
17.01.2003 GB 030122
23.07.2003 US 489441 P
24.12.2003 GB 0330016

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.09.2011

73 Titular/es: **DANISCO A/S**
Langebrogade 1, P.O. Box 17
1001 Copenhagen K., DK

72 Inventor/es: **Kreij, Arno De;**
Madrid, Susan, Mampusta;
Mikkelsen, Jørn, Dalgaard y
Søe, Jørn, Borch

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 364 654 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

Método de producción de un éster de hidroxiácido.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la bioconversión de lípidos con el fin de producir un éster de hidroxiácido mediante la utilización de una lipasa aciltransferasa.

10 Asimismo, la presente invención se refiere a la utilización de una lipasa aciltransferasa para bioconvertir un lípido en un éster de hidroxiácido.

Se da a conocer como referencia una lipasa aciltransferasa inmovilizada.

15 **Antecedentes de la técnica**

Las lipasas han sido ampliamente utilizadas en la bioconversión de lípidos para preparar productos de alto valor, por ejemplo ésteres de azúcar, para la utilización en un amplio abanico de industrias, incluyendo las industrias alimentarias y/o de piensos, las industrias cosmética y/o de cuidado de la piel, la industria oleoquímica y la industria farmacéutica.

20 En el caso de que los procedimientos de bioconversión requieran la hidrólisis de sustratos lipídicos, pueden utilizarse enzimas lipolíticas en ambientes con alto contenido de agua. Sin embargo, en el caso de que los procedimientos de bioconversión requieran reacciones de interesterificación o transesterificación, tal como la alcoholisis, la utilización de lipasas en ambientes con alto contenido de agua puede resultar perjudicial debido a reacciones de hidrólisis no deseadas, que resultan en productos biológicos no deseados y/o rendimientos más bajos del producto de bioconversión.

25 Típicamente, los procedimientos de bioconversión que requieren interesterificación y/o transesterificación utilizan lipasas en ambientes no acuosos tales como sistemas de aceite y/o en sistemas de solventes orgánicos, tales como butanol, metanol o hexano. Estos sistemas proporcionan un ambiente en el que tanto la molécula aceptora polar como la molécula donadora lipídica puede solubilizarse por lo menos parcialmente, y la lipasa presenta suficiente actividad enzimática. Aunque resulta necesaria una pequeña cantidad de agua para cualquier actividad enzimática, la cantidad de agua se mantiene estrictamente a nivel reducido para evitar la actividad hidrolítica del enzima.

30 Convencionalmente se han producido ésteres de azúcar, ésteres de proteína o ésteres de hidroxiácido mediante síntesis química utilizando catalizadores inorgánicos. Los procedimientos convencionales de bioconversión para la producción de ésteres de azúcar o ésteres de hidroxiácido utilizan lipasas en ambientes de solventes orgánicos o líquidos supercríticos en los que únicamente existe una cantidad reducida (o nula) de agua.

35 Lecointe *et al.*, *Biotechnology Letters* Vol. 18, nº 8 (agosto):869-874, dan a conocer un estudio de varias lipasas y su actividad en un medio acuoso sobre la producción de éster metílico o éster butílico a partir de metanol y butanol, respectivamente. Lecointe *et al.* enseñan una lipasa/aciltransferasa de *Candida parapsilosis* que, a medida que se incrementaban las concentraciones de metanol o de butanol, mostraba una actividad de hidrólisis reducida y una capacidad incrementada del enzima de producir éster metílico y éster butílico. La utilización de una lipasa/aciltransferasa de *C. parapsilosis* en la producción de ácido hidroxámico graso se enseña en Vaysse *et al.*, *J. of Biotechnology* 53:41-46, (1997).

40 La patente WO 00/05396 da a conocer la utilización de un agente de conversión para preparar a partir de un material alimentario un alimento que comprende por lo menos un ingrediente funcional, en el que por lo menos un ingrediente funcional ha sido generado a partir de por lo menos un constituyente del material alimentario por parte del agente de conversión.

45 Las lipasa:colesterol aciltransferasas han sido conocidas desde hace tiempo (ver, por ejemplo, Buckley, *Biochemistry* 22:5490-5493, 1983). En particular, se han encontrado las glicerofosfolípido:colesterol aciltransferasas (con frecuencia denominadas GCAT), que, al igual que las lecitina:colesterol aciltransferasas (LCAT) vegetales y/o de mamífero, catalizan la transferencia de ácidos grasos entre la fosfatidilcolina y el colesterol.

50 Upton y Buckley (*TIBS* 20:178-179, mayo de 1995) y Brumlik y Buckley (*J. of Bacteriology*, páginas 2060 a 2064, abril de 1996) enseñan una lipasa/aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que presenta la capacidad de llevar a cabo la transferencia de acilos hasta aceptores alcohol en un medio acuoso.

Además, también se ha introducido la secuencia de la aciltransferasa de *A. salmonicida* en la base de datos EBI UNIPROT el 1 de marzo de 2001 bajo el nº de acceso Q9F7Y6.

Aspectos del sumario de la presente invención

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para producir un éster de hidroxiácido, comprendiendo el método la mezcla de un donador de acilos, un aceptor de acilos y agua para producir un ambiente de alto contenido de agua, comprendiendo entre el 5% y el 98% de agua, en el que dicho donador de acilos es un sustrato lípido seleccionado de entre uno o más del grupo que consiste en un fosfolípido, un lisofosfolípido, un triacilglicérido, un diglicérido, un glucolípido o un lisoglucolípido y siendo dicho aceptor de acilos un hidroxiácido, y poner en contacto la mezcla con una lípido aciltransferasa, de manera que dicha lípido aciltransferasa cataliza una cualquiera o las dos reacciones siguientes: alcoholisis o transesterificación, en las que la lípido aciltransferasa se caracteriza como un enzima que presenta actividad aciltransferasa y que comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos aminoácidos siguientes: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona la utilización de una lípido aciltransferasa para producir un éster de hidroxiácido mediante catálisis de una cualquiera o las dos reacciones siguientes: alcoholisis y transesterificación, en una mezcla de un donador de acilos, un aceptor de acilos y agua, comprendiendo la mezcla entre el 5% y el 98% de agua, en la que dicho donador de acilos es un sustrato lípido seleccionado de entre uno o más del grupo que consiste en un fosfolípido, un lisofosfolípido, un triacilglicérido, un diglicérido, un glucolípido o un lisoglucolípido, y siendo dicho aceptor de acilos un hidroxiácido, en el que la lípido aciltransferasa se caracteriza como un enzima que presenta actividad de aciltransferasa y que comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos aminoácidos siguientes: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

También se dan a conocer un éster de hidroxiácido producido mediante un método según la presente invención, un farmacéutico, un cosmético, un producto alimentario, un pienso, una pintura que comprende un éster de hidroxiácido producido mediante un método según la presente invención, y un enzima lípido aciltransferasa inmovilizado.

Aspectos detallados de la presente invención

La expresión "lípido aciltransferasa" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un enzima que además de presentar actividad de lipasa (generalmente clasificada como E.C.3.1.1.x de acuerdo con la Enzyme Nomenclature Recommendations (1992) del comité de nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology) también presenta actividad de aciltransferasa (generalmente clasificada como E.C.2.3.1.x), según la cual el enzima es capaz de transferir un grupo acilo de un lípido a uno o más de los sustratos aceptores siguientes: un carbohidrato, una proteína, una subunidad de proteína o un hidroxiácido.

Preferentemente, el "aceptor de acilos" según la presente invención no es agua.

El enzima es capaz de transferir un grupo acilo de un sustrato lípido a un hidroxiácido.

Convenientemente, el hidroxiácido puede ser uno o más de los ácidos siguientes: ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido glicólico, ácido málico, ácido alfa-hidroxietanoico, ácido alfa-hidroxi octanoico, ácido alfa-hidroxicaprílico, ácido hidroxicaprílico, ácido glucónico, ácido lactobiónico o ácido maltobiónico.

Convenientemente, el hidroxiácido puede ser un ácido frutal, por ejemplo uno o más de entre ácido málico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico o ácido glicólico.

En una forma de realización, preferentemente el hidroxiácido es uno o más de los ácidos siguientes: ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico o ácido málico.

El término "hidroxiácido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ácido carboxílico en el que uno o más átomos de hidrógeno del grupo alquilo han sido sustituidos por un grupo hidroxilo.

En un aspecto, la lípido aciltransferasa puede, además de ser capaz de transferir un grupo acilo de un sustrato lípido a un hidroxiácido, la lípido aciltransferasa además es capaz de transferir el grupo acilo de un lípido a uno o más de los siguientes: un esteroles y/o un estanol, en particular un fitoesteroles y/o un fitoestanol, un carbohidrato, una proteína o una subunidad de proteína.

Convenientemente, en el caso de que el sustrato lípido sea un fosfolípido, puede ser una lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina. El término lecitina tal como se utiliza en la presente memoria comprende fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

Convenientemente, en el caso de que el sustrato lípido sea un lisofosfolípido, puede ser una lisolecitina, por ejemplo lisofosfatidilcolina. El término lisofosfatidilcolina tal como se utiliza en la presente memoria es sinónimo del término lisolecitina y estos términos pueden utilizarse intercambiabilmente en la presente memoria.

Convenientemente, en el caso de que el sustrato lípido sea un glucolípido, puede ser un digalactosildiglicérido

(DGDG), por ejemplo.

El sustrato lípido puede denominarse en la presente memoria, "donador de acilos del lípido" o "donador de acilos". Estas expresiones se utilizan intercambiamente en la presente memoria.

5 Para algunos aspectos, preferentemente el sustrato lípido sobre el que actúa la lípido aciltransferasa es un fosfolípido, tal como lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina.

10 Para algunos aspectos, preferentemente el sustrato lípido es un glucolípido, tal como DGDG, por ejemplo.

Para algunos aspectos, el sustrato lípido puede ser un lípido alimentario, es decir, un componente lipídico de un producto alimentario.

15 Para algunos aspectos, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede ser incapaz, o sustancialmente incapaz, de actuar sobre un triglicérido y/o sobre un 1-monoglicérido y/o 2-monoglicérido.

20 Convenientemente, el sustrato lípido o donador de acilos de lípido puede ser uno o más lípidos presentes en uno o más de los sustratos siguientes: grasas, incluyendo manteca, sebo y grasa de mantequilla; aceites, incluyendo aceites extraídos o derivados del aceite de palma, el aceite de girasol, el aceite de soja, el aceite de azafrán, el aceite de semilla del algodón, el aceite de cacahuete, el aceite maíz, el aceite de oliva, el aceite de cacahuete, el aceite de coco y el aceite de colza. Las lecitinas procedentes de la soja, la colza o la yema de hueso también son un sustrato lípido adecuado. El sustrato lípido puede ser un lípido de la avena u otros materiales de tipo vegetal que contengan galactolípidos.

25 Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse de entre lípidos que presentan una longitud de las cadenas de ácidos grasos de entre 8 y 22 carbonos.

30 Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse de entre los lípidos que presentan una longitud de cadena de los ácidos grasos de entre 16 y 22 carbonos, más preferentemente de entre 16 y 20 carbonos.

35 Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse de entre los lípidos que presentan una longitud de la cadena de ácidos grasos no superior a 14 carbonos, convenientemente de entre los lípidos que presentan una longitud de cadena de los ácidos grasos de entre 4 y 14 carbonos, convenientemente de entre 4 y 10 carbonos, convenientemente de entre 4 y 8 carbonos.

Preferentemente, el donador de acilos no es un ácido graso libre.

40 Preferentemente, el donador de acilos no es un éster de carbohidrato (azúcar).

45 Convenientemente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede mostrar una o más de las actividades de lipasas siguientes: actividad de glucolipasa (E.C.3.1.1.26), actividad de triacilglicerol lipasa (E.C.3.1.1.3), actividad de fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4) o actividad de fosfolipasa A1 (E.C.3.1.1.32). La expresión "actividad de glucolipasa" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la "actividad de galactolipasa".

50 Convenientemente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede presentar por lo menos una o más de las actividades siguientes: actividad de glucolipasa (E.C.3.1.1.26) y/o actividad de fosfolipasa A1 (E.C.3.1.1.32) y/o actividad de fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4).

55 Para algunos aspectos, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede presentar por lo menos actividad de glucolipasa (E.C.3.1.1.26).

60 Convenientemente, para algunos aspectos, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede ser capaz de transferir un grupo acilo de un glucolípido y/o de un fosfolípido a uno o más de los sustratos aceptores siguientes: un carbohidrato, una proteína, una subunidad de proteína y un hidroxiaácido.

65 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo de un glucolípido y/o de un fosfolípido a un carbohidrato, formando por lo menos un éster de carbohidrato.

Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo de un glucolípido y/o de un fosfolípido a una proteína o a una subunidad de proteína, formando por lo menos un éster de proteína (o un condensado de proteína-ácido graso) o un éster de subunidad de proteína.

La expresión "éster de subunidad de proteína" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al éster formado a partir de cualquier subunidad de proteína, tal como un éster de dipéptido, un éster de oligopéptido, un éster de

polipéptido o un éster de hidrolizado de proteínas, por ejemplo.

Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención no muestra actividad de triacilglicerol lipasa (E.C.3.1.1.3).

5 Preferentemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede caracterizarse a partir de los criterios siguientes:

10 (i) el enzima presenta actividad de aciltransferasa que puede definirse como actividad de transferencia de éster, en la que la parte acilo de un enlace éster original de un donador de acilos de lípido se transfiere a un aceptor de acilos que es un carbohidrato, una proteína, una subunidad de proteína o un hidroxácido, formando un nuevo éster, es decir, un éster de carbohidrato y/o un éster de proteína y/o un éster de subunidad de proteína y/o un éster de hidroxácido, y

15 (ii) el enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos aminoácidos siguientes: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

Preferentemente, X del motivo GDSX es L. De esta manera, preferentemente el enzima según la presente invención comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GSDL.

20 El motivo GDSX comprende cuatro aminoácidos conservados. Preferentemente, la serina en el motivo es una serina catalítica del enzima lípido aciltransferasa. Convenientemente, la serina del motivo GDSX puede encontrarse en una posición correspondiente a Ser-16 en el enzima lipolítico de *Aeromonas hydrophila* que se enseña en Brumlik y Buckley (Journal of Bacteriology 178(7):2060-2064, abril de 1996).

25 Con el fin de determinar si una proteína presenta el motivo GDSX según la presente invención, la secuencia preferentemente se compara con los perfiles de modelos ocultos de Markov (perfiles HMM) de la base de datos pfam.

30 Pfam es una base de datos de familias de dominio de proteína. Pfam contiene alineaciones revisadas de múltiples secuencias para cada familia, así como perfiles de modelos ocultos de Markov (perfiles HMM) para identificar dichos dominios en secuencias nuevas. Puede encontrarse una introducción a Pfam en Bateman A. *et al.*, Nucleic Acids Res. 30:276-280, 2002. Los modelos ocultos de Markov se utilizan en varias bases de datos destinadas a clasificar proteínas, para una revisión ver Bateman A. y Haft D.H., Brief Bioinform. 3:236-245, 2002.

35 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12230032&dopt=Abstract
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11752314&dopt=Abstract

40 Para una explicación detallada de los modelos ocultos de Markov y cómo se aplican en la base de datos Pfam, ver Durbin R., Eddy S. y Krogh A., Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids, Cambridge University Press, 1998, ISBN 0-521-62041-4. El paquete informático Hammer puede obtenerse de la Washington University, St. Louis, USA.

45 Alternativamente, el motivo GDSX puede identificarse utilizando el paquete informático Hammer; las instrucciones se proporcionan en Durbin R., Eddy S. y Krogh A., Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press, 1998, ISBN 0-521-62041-4 y referencias citadas en el mismo, y el perfil HMMER2 proporcionado en la presente memoria.

50 Puede obtenerse acceso a la base de datos PFAM, por ejemplo, mediante varios servidores actualmente situados en los sitios de internet siguientes:

55 <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>
<http://pfam.wustl.edu/>
<http://pfam.jouy.inra.fr/>
<http://pfam.cgb.ki.se/>

60 La base de datos ofrece un motor de búsqueda en el que puede introducirse una secuencia de proteína. Utilizando los parámetros por defecto de la base de datos, a continuación se analiza la secuencia de la proteína para la presencia de dominios de Pfam. El dominio GDSX es un dominio establecido en la base de datos y de esta manera su presencia en cualquier secuencia de búsqueda será reconocida. La base de datos devuelve la alineación de la secuencia de consenso Pfam00657 con la secuencia de búsqueda.

Una alineación múltiple, incluyendo *Aeromonas salmonicida* o *Aeromonas hydrophila*, puede obtenerse mediante:

65 a) la obtención manual de una alineación de la proteína de interés con la secuencia de consenso Pfam00657 y la obtención de una alineación de P10480 con la secuencia de consenso Pfam00657 siguiendo el procedimiento

descrito anteriormente, o

b) a través de la base de datos:

5 tras la identificación de la secuencia de consenso Pfam00657, la base de datos ofrece la opción de mostrar una alineación de la secuencia de búsqueda con la alineación inicial de la secuencia de consenso Pfam00657. P10480 es parte de esta alineación inicial y se indica como GCAT_AERHY. Tanto la secuencia de búsqueda como P10480 se muestran en la misma ventana.

10 Secuencia de referencia de *Aeromonas hydrophila*:

los residuos de la lipasa GDSX de *Aeromonas hydrophila* se numeran en el archivo de NCBI nº P10480; los números en este texto se refieren a los números proporcionados en dicho archivo que en la presente invención se utilizan para determinar residuos aminoácidos específicos que, en una forma de realización preferente, se encuentran presentes en los enzimas lípido aciltransferasa de la invención.

Se llevó a cabo la alineación de Pfam (figuras 33 y 34)

Pueden reconocerse los residuos conservados siguientes y, en una forma de realización preferente, pueden encontrarse presentes en los enzimas para la utilización en las composiciones y métodos de la invención:

Bloque 1 - bloque GDSX

```
hid hid hid hid Gly Asp Ser hid
 28 29 30 31 32 33 34 35
```

25

Bloque 2 - bloque GANDY

```
hid Gly hid Asn Asp hid
130 131 132 133 134 135
```

30 Bloque 3 - bloque HPT

```
His
309
```

35 en donde "hid" se refiere a un residuo hidrofóbico seleccionado de entre Met, Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Cys, His, Lys, Trp, Tyr y Phe.

Preferentemente, el enzima lípido aciltransferasa para la utilización en las composiciones/métodos de la invención puede alinearse utilizando la secuencia de consenso Pfam00657.

40 Preferentemente, una correspondencia positiva con el perfil del modelo oculto de Markov (perfil HMM) de la familia del dominio pfam00657 indica la presencia del dominio GDSL o GDSX según la presente invención.

45 Preferentemente, al encontrarse alineado con la secuencia de consenso Pfam00657, la lípido aciltransferasa para la utilización en las composiciones/métodos de la invención presenta por lo menos un, preferentemente más de un, preferentemente más de dos, de los siguientes: un bloque GDSX, un bloque GANDY o un bloque HPT. Convenientemente, la lípido aciltransferasa puede presentar un bloque GDSx y un bloque GANDY. Alternativamente, el enzima puede presentar un bloque GDSX y un bloque HPT. Preferentemente, el enzima comprende por lo menos un bloque GDSx.

50 Preferentemente, al encontrarse alineado con la secuencia de consenso Pfam00657, el enzima para la utilización en las composiciones/métodos de la invención presenta por lo menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente más de dos, preferentemente más de tres, preferentemente más de cuatro, preferentemente más de cinco, preferentemente más de seis, preferentemente más de siete, preferentemente más de ocho, preferentemente más de nueve, preferentemente más de diez, preferentemente más de once, preferentemente más de doce, preferentemente más de trece, preferentemente más de catorce de los residuos aminoácidos siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica de *A. hydrophila* de referencia, es decir, la secuencia SEC ID nº 32: 28hid, 29hid, 30hid, 31hid, 32gly, 33Asp, 34Ser, 35hid, 130hid, 131Gly, 132Hid, 133Asn, 134Asp, 135hid y 309His.

60 El dominio GDSX pfam00657 es un identificador único que distingue de otros enzimas las proteínas que presentan dicho dominio.

La secuencia de consenso pfam00657 se presenta en la figura 1 como SEC ID nº 1. Se deriva de la identificación de

la familia de pfam 00657, versión 6 de la base de datos, que también puede denominarse pfam00657.6 en la presente memoria.

5 La secuencia de consenso puede actualizarse mediante la utilización de versiones adicionales de la base de datos pfam.

Por ejemplo, las figuras 33 y 34 muestran la alineación de pfam de la familia 00657, versión 11 de la base de datos, que también se denomina pfam00657.11 en la presente memoria.

10 Se detecta la presencia de los bloques GDSx, GANDY y HPT en la familia 00657 de pfam de ambas versiones de la base de datos. Pueden utilizarse versiones adicionales de la base de datos pfam para identificar la familia 00657 de pfam.

15 Preferentemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede caracterizarse a partir de los criterios siguientes:

(i) el enzima presenta actividad de aciltransferasa que puede definirse como actividad de transferencia de ésteres, en la que la parte acilo de un enlace éster original de un donador de acilos de lípido se transfiere a uno o más aceptores de acilo que son carbohidratos, proteínas, subunidades de proteínas o hidroxiaácidos, para formar un nuevo éster, es decir, un éster de carbohidrato y/o un éster de proteína y/o un éster de subunidad de proteína y/o un éster de hidroxiaácido,

(ii) el enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos aminoácidos siguientes: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S,

(iii) el enzima comprende His-309 o comprende un residuo histidina en una posición correspondiente a His-309 en el enzima lipolítico de *Aeromonas hydrophila* mostrado en la figura 2 (SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32).

Preferentemente, el residuo aminoácido del motivo GDSX es L.

30 En la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32, los primeros 18 residuos aminoácidos forman una secuencia de señal. His-309 de la secuencia de longitud completa, es decir, la proteína que incluye la secuencia de señal, es equivalente a His-291 de la parte madura de la proteína, es decir la secuencia sin la secuencia de señal.

35 Preferentemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención comprende la tríada catalítica siguiente: Ser-34, Asp-134 e His-309, o comprende un residuo serina, un residuo ácido aspártico y un residuo histidina, respectivamente, en las posiciones correspondientes a Ser-34, Asp-134 e His-309 en el enzima lipolítico de *Aeromonas hydrophila* mostrado en la figura 2 (SEC ID nº 2) o en la figura 28 (SEC ID nº 32). Tal como se ha indicado anteriormente, en la secuencia mostrada en SEC ID nº 2 ó en SEC ID nº 32, los primeros 18 residuos aminoácidos forman una secuencia de señal. Ser-34, Asp-134 e His-309 de la secuencia de longitud completa, es decir la proteína incluyendo la secuencia de señal, son equivalentes a Ser-16, Asp-116 e His-291 de la parte madura de la proteína, es decir, la secuencia sin la secuencia de señal. En la secuencia de consenso pfam00657, tal como se proporciona en la figura 1 (SEC ID nº 1), los residuos del sitio activo corresponden a Ser-7, Asp-157 e His-348.

45 Preferentemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede caracterizarse a partir de los criterios siguientes:

(i) el enzima presenta actividad de aciltransferasa que puede definirse como actividad de transferencia de ésteres, en la que la parte acilo de un enlace éster original de un primer donador de acilos de lípido se transfiere a uno o más aceptores de acilos que son carbohidratos, proteínas, subunidades de proteínas o hidroxiaácidos, para formar un nuevo éster, es decir, un éster de carbohidrato y/o un éster de proteína y/o un éster de subunidad de proteína y/o un éster de hidroxiaácido, y

(ii) el enzima comprende por lo menos Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309, o comprende los residuos glicina, ácido aspártico, serina, ácido aspártico e histidina en las posiciones correspondientes a Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309, respectivamente, en el enzima lipolítico de *Aeromonas hydrophila* mostrado en la figura 2 (SEC ID nº 2) o en la figura 28 (SEC ID nº 32).

60 Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede obtenerse, preferentemente se obtiene, a partir de organismos de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfibacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccaromyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*.

65 Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede obtenerse, preferentemente se obtiene, a partir de uno o más de los organismos siguientes: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*,

Streptomyces coelicolor, *Streptomyces rimosus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Desulfotobacterium dehalogenans*, *Bacillus sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis* y *Candida parapsilosis*.

En un aspecto, preferentemente el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede obtenerse, preferentemente se obtiene, a partir de uno o más de entre *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida*.

Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes:

- (i) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 2 (ver la figura 2),
- (ii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 3 (ver la figura 3),
- (iii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 4 (ver la figura 4),
- (iv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 5 (ver la figura 5),
- (v) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 6 (ver la figura 6),
- (vi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 12 (ver la figura 14),
- (vii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 20 (ver la figura 16),
- (viii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 22 (ver la figura 18),
- (ix) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 24 (ver la figura 20),
- (x) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 26 (ver la figura 22),
- (xi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 28 (ver la figura 24),
- (xii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 30 (ver la figura 26),
- (xiii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 32 (ver la figura 28),
- (xiv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 34 (ver la figura 30), o

una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 75% o superior respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 12, SEC ID nº 20, SEC ID nº 22, SEC ID nº 24, SEC ID nº 26, SEC ID nº 28, SEC ID nº 30, SEC ID nº 32 ó SEC ID nº 34.

Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 2 ó como SEC ID nº 3 ó SEC ID nº 32 ó SEC ID nº 34, o comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 75% o más, preferentemente de 80% o más, preferentemente de 85% o más, preferentemente de 90% o más, preferentemente de 95% o más, respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 2 ó la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 3 ó la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 32 ó la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 34.

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad se basa en el número de elementos de secuencia que son iguales. El grado de identidad de acuerdo con la presente invención puede determinarse convenientemente por medio de programas informáticos conocidos de la técnica, tales como GAP proporcionado en el programa informático GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, versión 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, US53711) (Needleman y Wunsch, J. of Molecular Biology 48:443-45, 1970) utilizando los parámetros siguientes para la comparación de secuencias polipeptídicas: penalización por creación de HUECO de 3,0 y penalización por extensión de HUECO de 0,1.

Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de 80% o más, preferentemente 85% o más, más preferentemente 90% o más, y todavía más preferentemente 95% o más, respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 12, SEC ID nº 20, SEC ID nº 22, SEC ID nº 24, SEC ID nº 26, SEC ID nº 28, SEC ID nº 30, SEC ID nº 32 ó SEC ID nº 34.

Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes:

- (a) una secuencia de aminoácidos mostrada como residuos aminoácidos 1 a 100 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32,
- (b) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos aminoácidos 101 a 200 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32,
- (c) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos aminoácidos 201 a 300 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32, o

(d) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 75% o más, preferentemente de 85% o más, más preferentemente de 90% o más, todavía más preferentemente de 95% o más, respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en (a)-(c), anteriormente.

5 Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes:

(a) una secuencia de aminoácidos mostrada como residuos aminoácidos 28 a 39 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32,

10 (b) una secuencia de aminoácidos mostrada como residuos aminoácidos 77 a 88 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32,

15 (c) una secuencia de aminoácidos mostrada como residuos aminoácidos 126 a 136 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32,

(d) una secuencias de aminoácidos mostrada como residuos aminoácidos 163 a 175 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32,

20 (e) una secuencia de aminoácidos mostrada como residuos aminoácidos 304 a 311 de la secuencia SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32,

25 (f) una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 75% o más, preferentemente de 85% o más, más preferentemente de 90% o más, todavía más preferentemente de 95% o más, respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en (a)-(e) anteriormente.

Convenientemente, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos producida mediante la expresión de una o más de las secuencias de nucleótidos siguientes:

- 30 (a) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 7 (ver la figura 9),
 (b) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 8 (ver la figura 10),
 (c) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 9 (ver la figura 11),
 (d) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 10 (ver la figura 12),
 (e) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 11 (ver la figura 13),
 35 (f) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 13 (ver la figura 15),
 (g) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 21 (ver la figura 17),
 (h) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 23 (ver la figura 19),
 (i) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 25 (ver la figura 21),
 (j) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 27 (ver la figura 23),
 40 (k) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 29 (ver la figura 25),
 (l) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 31 (ver la figura 27),
 (m) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 33 (ver la figura 29),
 (n) la secuencia de nucleótido mostrada como SEC ID nº 35 (ver la figura 31), o
 45 (o) una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de 75% o superior respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 13, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25, SEC ID nº 27, SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33 ó SEC ID nº 35.

50 Convenientemente, la secuencia de nucleótidos puede presentar una identidad de 80% o superior, preferentemente de 85% o superior, más preferentemente de 90% o superior, y todavía más preferentemente de 95% o superior, respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 13, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25, SEC ID nº 27, SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33 ó SEC ID nº 35.

55 En un aspecto, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede ser una lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) o variante de la misma (por ejemplo una variante construida mediante evolución molecular).

60 Son conocidas de la técnica las LCAT adecuadas y pueden obtenerse a partir de uno o más de los organismos siguientes, por ejemplo: mamíferos, ratas, ratones, pollos, *Drosophila melanogaster*, plantas, incluyendo *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, nemátodos, hongos y levaduras.

65 En una forma de realización, el enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede ser la lípido aciltransferasa obtenible, preferentemente obtenida, a partir de las cepas *E. coli* TOP 10 que portan pPet12aAhydro y pPet12aASalmo, depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen K, Dinamarca, bajo el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes en el National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB), 23

St. Machar Street, Aberdeen, Escocia, GB, el 22 de diciembre de 2003, bajo los números de acceso NICMB 41204 y NCIMB 41205, respectivamente.

5 El término "transferasa" tal como se utiliza en la presente memoria es intercambiable con la expresión "lípidico aciltransferasa".

Convenientemente, la lípidico aciltransferasa tal como se define en la presente memoria cataliza una o las dos reacciones siguientes: transesterificación y alcoholisis.

10 De esta manera, de acuerdo con la presente invención, puede conseguirse una o más de las propiedades ventajosas siguientes: la bioconversión de lípidos para formar uno o más de entre un éster de carbohidrato, un éster de proteína, un éster de subunidad de proteína o un éster de hidroxiácido, puede tener lugar en un ambiente de alto contenido de agua que no comprenda ningún solvente orgánico o una cantidad reducida de solvente orgánico en comparación con los procedimientos convencionales de bioconversión.

15 El término "bioconversión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la modificación de un compuesto orgánico para producir otro compuesto orgánico y/o a la síntesis de compuestos orgánicos a partir de otros compuestos orgánicos mediante catálisis enzimática.

20 El término "transesterificación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la transferencia catalizada enzimáticamente de un grupo acilo de un lípidico donador (diferente de un ácido graso libre) a un aceptor de acilos (diferente de agua). Para mayor claridad, la utilización del término "transesterificación" tal como se utiliza en la presente memoria incluye la transferencia de un grupo acilo de un lípidico donador a un aceptor de acilos (diferente de agua) en el que el aceptor de acilos comprende un grupo químico adecuado, que puede ser, por ejemplo, un grupo -OH o -SH.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alcoholisis" se refiere al corte enzimático de un enlace covalente de un derivado ácido mediante la reacción con un grupo alcohol ROH, de manera que uno de los productos se combina con el H del grupo alcohol y el otro producto se combina con el grupo OR del grupo alcohol.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hidrólisis" se refiere a la transferencia enzimáticamente catalizada de un grupo acilo de un lípidico al grupo OH de una molécula de agua. La transferencia de acilos que resulta de la hidrólisis requiere la separación de la molécula de agua.

35 El término "interesterificación" se refiere a la transferencia enzimáticamente catalizada de grupos acilo entre un lípidico donador y un lípidico aceptor, en el que el lípidico donador no es un grupo acilo libre. En otras palabras, el término "interesterificación" se refiere al intercambio de un ácido graso entre dos moléculas de lípidico.

40 En un aspecto, la lípidico aciltransferasa tal como se define en la presente memoria cataliza la interesterificación.

45 Convenientemente, el método o uso según la presente invención puede comprender además una o más de las etapas siguientes: disolver el aceptor de acilos en agua, añadir un lípidico donador de acilos a un aceptor de acilos disuelto para formar un sistema de dos fases o una emulsión; agitar o sonicar la mezcla de reacción; calentar la mezcla de reacción, por ejemplo para desnaturalizar el enzima; separar la fase acuosa de la fase grasa/emulsionante mediante técnicas estándares de separación tales como la extracción en solvente o la evaporación de agua, por ejemplo fraccionando la fase grasa mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, la cristalización o la destilación bajo alto vacío. Convenientemente, puede llevarse a cabo una o más etapas de entre el calentamiento, la separación o el fraccionamiento tras alcanzar la reacción el equilibrio.

50 En una forma de realización, puede inmovilizarse la lípidico aciltransferasa para la utilización en los métodos de la presente invención. En el caso de que el enzima se encuentre inmovilizado, la mezcla que comprende un donador de acilos, un aceptor de acilos y agua se pasa a través de una columna, por ejemplo que comprende el enzima inmovilizado. Mediante la inmovilización del enzima, resulta posible reutilizarlo fácilmente.

55 Convenientemente, el enzima inmovilizado puede utilizarse en un reactor de flujo o en un reactor por lotes que contenga una mezcla de reacción que comprende un aceptor de acilos disuelto en agua y un lípidico donador de acilos en forma de un sistema de dos fases o en forma de una emulsión. La mezcla de reacción opcionalmente puede agitarse o sonicarse. Tras alcanzar la reacción el equilibrio, por ejemplo, pueden separarse la mezcla de reacción y el enzima inmovilizado. Convenientemente, el producto de reacción puede fraccionarse, por ejemplo mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, cristalización o destilación bajo alto vacío.

60 La lípidico aciltransferasa inmovilizada puede prepararse utilizando técnicas de inmovilización conocidas de la técnica. Existen numerosos métodos de preparación de enzimas inmovilizados, que resultarán evidentes para el experto en la materia (por ejemplo las técnicas a las que se hace referencia en la patente EP 0 746 608, o en Balcao V.M., Paiva A.L., Malcata F.X., Enzyme Microb. Technol. 18(6):392-416, 1 de mayo de 1996, o Retz M.T., Jaeger K.E., Chem. Phys. Lipids 93(1-2):3-14, junio de 1998; Bornscheuer U.T., Bessler C., Srinivas R., Krishna S.H., Trends

Biotechnol. 20(10):433-7, octubre de 2002; Plou *et al.*, J. Biotechnology 92:55-66, 2002; Warmuth *et al.*, BioForum 9:282-283, 1992; Ferrer *et al.*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 75:1-8, 2000, o Christensen *et al.*, Nachwachsende Rohstoff 10:98-105, 1998; Petersen y Christensen, Applied Biocatalysis, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000. Entre las técnicas que pueden utilizarse en la presente memoria se incluyen el acoplamiento covalente a Eupergit C, la adsorción sobre polipropileno y la granulación con sílice, por ejemplo.

La expresión "ambiente de alto contenido de agua" tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente se refiere a un ambiente que presenta un contenido bajo o nulo de solvente orgánico, preferentemente de contenido bajo o nulo de un solvente orgánico polar. La expresión solvente orgánico tal como se utiliza en la presente memoria preferentemente no comprende aceites alimentarios en el caso de que se utilicen como sustratos lípidos, y preferentemente no comprende aceites alimentarios que presentan un contenido alto en lípidos no polares, por ejemplo. Convenientemente, el ambiente de alto contenido de agua según la presente invención puede comprender menos de 50% en volumen de solventes orgánicos, menos de 30% en volumen de solventes orgánicos, más preferentemente menos de 15% en volumen de solventes orgánicos, más preferentemente menos de 5% en volumen de solventes orgánicos, más preferentemente menos de 1% en volumen de solventes orgánicos, más preferentemente menos de 0,5% en volumen de solventes orgánicos y más preferentemente 0% en volumen de solventes orgánicos.

En el caso de que se produzca un éster de carbohidrato según la presente invención, el éster de carbohidrato preferentemente es un éster de oligosacárido, un éster de monosacárido o un éster de disacárido.

Convenientemente, el éster de carbohidrato producido según la presente invención puede ser uno o más de los siguientes: éster de glucosa, éster de fructosa, éster de anhidrofructosa, éster de maltosa, éster de lactosa, éster de galactosa, éster de xilosa, éster de xilooligosacárido, éster de arabinosa, éster de maltooligosacárido, éster de tagatosa, éster de sacarosa, éster de microtecina, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T o éster de cortalcerona.

Preferentemente, el éster de carbohidrato producido según la presente invención es uno o más de los siguientes: monoéster de carbohidrato, monoéster de azúcar, monoéster de oligosacárido, monoéster de trisacárido, monoéster de disacárido, monoéster de monosacárido, monoéster de glucosa, monoéster de fructosa, monoéster de anhidrofructosa, monoéster de maltosa, monoéster de lactosa, monoéster de galactosa, monoéster de xilosa, monoéster de xilooligosacárido, monoéster de arabinosa, monoéster de maltooligosacárido, monoéster de tagatosa, monoéster de sacarosa, éster de microtecina, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T o éster de cortalcerona.

En una forma de realización, el éster de microtecina, el éster de ascopirona P, el éster de ascopirona T y/o el éster de cortalcerona pueden funcionar como agente antimicrobiano. Alternativamente, o adicionalmente, el éster de microtecina, el éster de ascopirona P, el éster de ascopirona T y/o el éster de cortalcerona puede funcionar como uno o los dos de entre antioxidante y/o emulsionante.

Preferentemente, la formación del éster de carbohidrato (en caso de encontrarse alguno) según la presente invención es independiente de la UDP-glucosa.

Preferentemente, el producto alimentario según la presente invención no comprende UDP-glucosa, o únicamente comprende UDP-glucosa en cantidades insignificantes.

Se ha encontrado que las lípido aciltransferasas utilizadas en los métodos de la invención presentan propiedades únicas en comparación con los enzimas lipolíticos en el aspecto de que presentan una preferencia marcada para la transferencia de grupos acilos de lípidos a aceptores diferentes del agua, incluso en presencia de cantidades significativas de agua. En una comparación con los enzimas de la técnica anterior, se encontró que la lípido aciltransferasa utilizada en la invención presentaba una actividad transferasa relativa elevada en presencia de 6% de agua, 54% de agua, 73% de agua, 89% de agua y aproximadamente 95% de agua. Los enzimas lipolíticos sometidos a ensayo no presentaban virtualmente actividad relativa de transferasa significativa a dichas concentraciones de agua.

El % de actividad de transferasa (es decir, la actividad de transferasa como porcentaje de la actividad enzimática total) puede determinarse mediante el protocolo siguiente:

Protocolo para la determinación del % de actividad de aciltransferasa.

Un sustrato al que se ha añadido una lípido aciltransferasa según la presente invención puede extraerse siguiendo la reacción enzimática con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1, y se aísla la fase orgánica que contiene el material lipídico y se analiza mediante GLC y HPLC según el procedimiento detallado posteriormente en la presente memoria. A partir de los análisis de GLC y HPLC, se determinan las cantidades de ácidos grasos libres y de uno o más de entre ésteres de carbohidratos, ésteres de proteína, ésteres de subunidad de proteína y ésteres de hidroxácido. Se analiza de la misma manera un sustrato de control al que no se ha añadido ninguna enzima según la presente invención.

Cálculo:

A partir de los resultados de los análisis de GLC y HPLC, puede calcularse el incremento de ácidos grasos libres y de ésteres de carbohidratos y/o de ésteres de proteína y/o de ésteres de subunidad de proteína y/o de hidroxiaácido:

Δ % de ácidos grasos = % ácidos grasos (enzima) - % ácidos grasos (control; Pm ácidos grasos=peso molecular medio de los ácidos grasos);

A = Δ % de éster de proteína/Pm de éster de proteína (en donde Δ % de éster de proteína = % de éster de proteína (enzima) - % de éster de proteína (control) y Pm de éster de proteína = peso molecular medio de los ésteres de proteína) - aplicable en el caso de que el aceptor de acilos sea una proteína;

B = Δ % de éster de carbohidrato/Pm de éster de carbohidrato (en donde Δ % de éster de carbohidrato = % de éster de carbohidrato (enzima) - % de éster de carbohidrato (control) y Pm de éster de carbohidrato = peso molecular medio de los ésteres de carbohidrato) - aplicable en el caso de que el aceptor de acilos sea un carbohidrato;

C = Δ % de éster de subunidad de proteína/Pm de éster de subunidad de proteína (en donde Δ % de éster de subunidad de proteína = % de éster de subunidad de proteína (enzima) - % de éster de subunidad de proteína (control) y Pm de éster de subunidad de proteína = peso molecular medio de los ésteres de subunidad de proteína) - aplicable en el caso de que el aceptor de acilos sea un subunidad de proteína; y

D = Δ % de éster de hidroxiaácido/Pm de éster de hidroxiaácido (en donde Δ % de éster de hidroxiaácido = % de éster de hidroxiaácido (enzima) - % de éster de hidroxiaácido (control) y Pm de éster de hidroxiaácido = peso molecular medio de los ésteres de hidroxiaácido) - aplicable en el caso de que el aceptor de acilos sea un hidroxiaácido.

Se calculó la actividad de transferasa como porcentaje de la actividad enzimática total:

$$\text{\% de actividad de transferasa} = \frac{A^* + B^* + C^* + D^* \times 100}{A^* + B^* + C^* + D^* + \Delta \text{\% ácidos grasos}/(\text{Pm ácidos grasos})}$$

* eliminar según resulte apropiado

Las actividades de lipasa y de aciltransferasa del enzima pueden evaluarse mediante los ensayos siguientes. De esta manera, puede obtenerse/identificarse una lípido aciltransferasa que presente las características enzimáticas definidas en la presente memoria.

Ensayo de transferasa en sustrato tamponado (ver el Ejemplo 6)

Los enzimas que actúan como lípido aciltransferasas para la utilización en los métodos de la invención pueden identificarse rutinariamente utilizando el ensayo que se enseña en la presente memoria en el Ejemplo 6. Este ensayo en lo sucesivo en la presente memoria se denomina "ensayo de transferasa en sustrato tamponado". En el Ejemplo 6, el enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* según la presente invención se analizó y se comparó con un abanico de enzimas lipolíticos no comprendidos en la presente invención. Tal como puede observarse, de entre los enzimas lipolíticos, únicamente LIOPAN® F (Novozymes, Dinamarca) presentaba alguna actividad de transferasa, aunque sólo un nivel muy reducido (1,3%).

Los enzimas adecuados para la utilización en los métodos de la invención pueden identificarse rutinariamente utilizando el ensayo de transferasa en sustrato tamponado. Utilizando este ensayo, en el que se utiliza un contenido muy elevado de agua, de aproximadamente 95%, las lípido aciltransferasas según la presente invención son aquéllas que presentan una actividad de aciltransferasa de por lo menos 2% (actividad relativa de transferasa), preferentemente por lo menos 5% de actividad relativa de transferasa, preferentemente por lo menos 10% de actividad relativa de transferasa, preferentemente por lo menos 15%, 20%, 25%, 26%, 28%, 30%, 40%, 50%, 60% ó 75% de actividad relativa de transferasa. Convenientemente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede presentar una actividad de aciltransferasa inferior a 28%, inferior a 30%, preferentemente inferior a 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100%.

Ensayo de transferasa en un ambiente de bajo contenido de agua

A modo de alternativa, o adicionalmente, a la utilización del "ensayo de transferasa en sustrato tamponado", las lípido aciltransferasas para la utilización según la presente invención pueden identificarse utilizando el "ensayo de transferasa en un ambiente de bajo contenido de agua".

Con el fin de determinar si un enzima es una lípido aciltransferasa según la presente invención, puede llevarse a cabo un "ensayo de transferasa en un ambiente de bajo contenido de agua", es decir en un ambiente aceitoso con

6% de agua según se enseña en el Ejemplo 9. El presente ejemplo ilustra que en un ambiente aceitosa con 6% de contenido de agua, la lípido aciltransferasa de la invención presenta una actividad relativa de transferasa elevada, en la que los enzimas lipolíticos de la técnica anterior presentan actividad hidrolítica.

5 En una forma de realización, la lípido aciltransferasa adecuada para la utilización en los métodos y/o usos según la presente invención es un enzima que, al someterlo a ensayo utilizando el "ensayo de transferasa en un ambiente de bajo contenido de agua", medido tras un periodo de tiempo seleccionado de entre 30, 20 ó 120 minutos, presenta una actividad relativa de transferasa de por lo menos 1%, preferentemente de por lo menos 2%, preferentemente de por lo menos 5%, preferentemente de por lo menos 10%, preferentemente de por lo menos 20%, preferentemente de por lo menos 30%, preferentemente de por lo menos 40%, preferentemente de por lo menos 50%, preferentemente de por lo menos 60%, preferentemente de por lo menos 70% y preferentemente de por lo menos 75%. Convenientemente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede presentar una actividad de 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ó 80% medida tras un periodo de tiempo de 10, 20, 30 ó 120 minutos utilizando el "ensayo de transferasa en un ambiente de bajo contenido de agua".

15 Tal como se ha indicado anteriormente, la lipasa aciltransferasa de la invención puede identificarse utilizando el "ensayo de transferasa en sustrato tamponado" o en el "ensayo de transferasa en un ambiente de bajo contenido de agua" utilizando colesterol como el aceptor de acilos. Evidentemente el experto en la materia conocerá con facilidad que, con correcciones evidentes de los métodos analíticos, puede utilizarse el "ensayo de transferasa en sustrato tamponado" o el "ensayo de transferasa en un ambiente de bajo contenido de agua" para determinar la actividad de lípido aciltransferasa para cualquier lípido donador de acilos o cualquier combinación de aceptor de acilos. El experto en la materia simplemente sustituirá, en caso necesario, el sustrato donador de acilos (por ejemplo un fosfolípido) por un sustrato donador de acilos alternativo (por ejemplo un glucolípido, un triacilglicérido) y/o sustituirá el aceptor de acilos (por ejemplo colesterol) por un sustrato aceptor de acilos alternativo (por ejemplo un carbohidrato, una proteína, una subunidad de proteína o un hidroxácido) (por ejemplo ver los Ejemplos 10 a 13).

20 La expresión "ambiente de alto contenido de agua" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier ambiente que comprende 5% a 98% de agua. Preferentemente el ambiente comprende un contenido de agua superior a 6%, preferentemente superior a 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90%. Convenientemente, el ambiente de alto contenido de agua puede comprender 20% a 98%, convenientemente 50% a 98%, convenientemente 70% a 98%, convenientemente 75% a 98% de agua.

35 En una realización, en la mezcla, la cantidad de lípido aciltransferasa medida en comparación con la cantidad de agua es de por lo menos 1:700, preferentemente de 1:10.000, medida en peso.

La expresión "bajo contenido de agua" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustrato o producto alimentario con un contenido de agua inferior a 5%, preferentemente inferior a 4%, 3%, 2%, 1% ó 0,5%.

40 Preferentemente, el método y/o uso según la presente invención puede llevarse a cabo a una temperatura de entre 15°C y 60°C, preferentemente a una temperatura de entre 20°C y 60°C, preferentemente de entre 20°C y 50°C, preferentemente de entre 20°C y 45°C y preferentemente de entre 20°C y 40°C.

45 Convenientemente, el método o uso según la presente invención comprende una etapa adicional de purificación y/o aislamiento del producto de reacción, es decir, uno o más de entre un éster de carbohidrato, un éster de proteína, un éster de subunidad de proteína o un éster de hidroxácido. De esta manera, preferentemente el producto de reacción se encuentra en una forma purificada y/o aislada.

50 El experto en la materia conoce numerosos métodos para la purificación de ésteres. A título de ejemplo, únicamente los ésteres producidos mediante los métodos/usos enseñados en la presente memoria pueden purificarse utilizando cromatografía, tal como mediante interacción hidrofóbica, filtración, centrifugación, extracción/destilación o cristalización en solvente. Las metodologías adecuadas se enseñan en Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KgaA, 2002.

55 La lípido aciltransferasa de la invención puede expresarse en cualquier huésped de expresión adecuado. Por ejemplo, la lípido aciltransferasa de la invención puede expresarse en *Bacillus subtilis* y puede purificarse mediante ultrafiltración y/o mediante precipitación en etanol y/o centrifugación, y posteriormente puede secarse mediante pulverización utilizando almidón (maltodextrina) como portador para el enzima. El enzima seco mediante pulverización puede estandarizarse a una actividad PLU especificada mediante la adición de portador adicional en forma de polvos. Las técnicas implicadas se encuentran bien establecidas y son rutinarias de la técnica.

60 En una forma de realización, el método según la presente invención es un procedimiento *in vitro*. El método convenientemente puede ser un procedimiento continuo o por lotes.

65 El enzima según la presente invención puede utilizarse en combinación con uno o más enzimas adicionales. De esta manera, se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención que, además del enzima de la invención, se ponga en contacto la mezcla con por lo menos un enzima adicional. Entre dichos enzimas adicionales

se incluyen enzimas degradantes tales como endoamilasas o exoamilasas, pululanases, enzimas desramificadores, hemicelulasas, incluyendo xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, por ejemplo la glucosa oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como una que oxide la maltosa, por ejemplo la hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas y hexosa oxidasa, y proteasas. La mezcla puede ponerse en contacto con el enzima de la invención y por lo menos un enzima adicional simultánea o secuencialmente.

En una forma de realización, por ejemplo puede utilizarse la lípido aciltransferasa en combinación con una lipasa que presente una o más de las actividades de lipasa siguientes: actividad de glucolipasa (E.C.3.1.1.26, actividad de triacilglicerol lipasa (E.C.3.1.1.3), actividad de fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4) o actividad de fosfolipasa A1 (E.C.3.1.1.32). Los enzimas lipasa adecuados son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, a título de ejemplo, las lipasas siguientes: LIOPAN[®] F y/o LECITASE[®] ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipasa A2 (por ejemplo la fosfolipasa A2 de LIPOMOD[™] 22L, de Biocatalysts, LIPOMAX[™] de Genecor), LIPOLASE[®] (Novozymes A/S, Dinamarca), las lipasas que se enseñan en las patentes WO 03/97835, EP 0.977.869 ó EP 1.193.314.

Usos

De esta manera, los métodos según la presente invención producen uno o más de entre un éster de carbohidrato, un éster de proteína, un éster de subunidad de proteína y un éster de hidroxiácido. Muchos de estos ésteres son emulsionantes útiles. A título de ejemplo únicamente, los ésteres de aminoácidos, los ésteres de péptidos, los ésteres de proteínas, los ésteres de carbohidratos y los ésteres de hidroxiácidos (tales como ésteres del ácido tartárico), por ejemplo, son emulsionantes funcionalmente importantes. Los emulsionantes resultan útiles en un amplio abanico de industrias, tales como la industria alimentaria, la industria de los piensos, la industria cosmética (por ejemplo en bases cosméticas), la industria farmacéutica (en tanto la síntesis farmacéutica como la formulación, por ejemplo) y en la industria de las pinturas, por ejemplo. Los emulsionantes pueden funcionar como agentes humectantes, ingredientes alimentarios e ingredientes activos.

Además, los condensados de proteína-ácido graso en virtud de sus excelentes propiedades fisiológicas resultan adecuados para la utilización en productos de cosmética y de higiene personal, por ejemplo. Por ejemplo, pueden utilizarse ésteres de proteína en preparaciones para ducha y baño, así como en champús y cremas corporales. Los condensados de proteína y ácido grasos también pueden resultar útiles en composiciones farmacéuticas, por ejemplo como base.

Los condensados de proteína y ácido graso son bien conocidos por su aplicación en la industria cosmética. Convencionalmente, estos productos se producen haciendo reaccionar hidrolizado de proteínas con cloruro de ácido graso bajo condiciones de Schotten-Baumann, utilizando agua como solvente (http://www.scf-online.com/english/26_e/rawmaterials26_e.htm#5).

Durante el desarrollo de los condensados de proteína-ácido graso resulta posible combinar las fuentes renovables ácidos grasos (procedentes de aceite vegetal) y proteínas, que pueden obtenerse tanto de residuos animales (cuero), así como de muchas plantas, para construir una superficie surfactante con una parte hidrofóbica (el ácido raso) y una hidrofílica (la proteína). Durante este procedimiento, el cloruro de ácido graso reaccionar con el grupo amina del aminoácido y forma el condensado de proteína-ácido graso (ver la figura 49). Se obtienen productos que presentan una excelente compatibilidad con al piel y además presentan un buen efecto limpiador.

El hecho de que incluso pequeñas adicionales del hidrolizado de proteínas aciladas presenten un efecto sinérgica sobre la compatibilidad con la piel de otros surfactantes resulta muy importante desde un punto de visto de formulación técnica. Una explicación para este efecto protector podría encontrarse en el comportamiento anfotérico del producto. Se produce una interacción entre el condensado de proteína-ácido graso y el colágeno de la piel. Esto conduce a la formación de una capa protectora, que reduce el ataque excesivo del surfactante sobre las capas superiores de la piel, su fuerte efecto desgrasante y la interacción directa de los surfactantes aniónicos con la piel.

En la rama cosmética, los surfactantes basados en proteínas se utilizan principalmente en productos suaves para ducha y baño, champús suaves, limpiadores faciales basados en surfactantes, preparaciones desrizantes y fijadores o preparaciones surfactantes para bebés.

Los condensados de hidrolizado de proteína-ácido graso también resultan útiles como bases para preparaciones farmacéuticas, por ejemplo para cremas y pomadas que contienen ingredientes activos para la aplicación tópica en la piel.

La presente invención proporciona un nuevo modo para producir condensados de proteína-ácido graso sin utilizar cloruro de ácido graso. La reacción según la presente invención se ilustra en la figura 50. Esta reacción puede llevarse a cabo en agua o en un sistema de tampón a temperatura baja sin formación de productos residuales.

La expresión "condensado de proteína-ácido graso" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la totalidad de los siguientes ésteres de proteína, ésteres de polipéptido, ésteres de dipéptido, ésteres de oligopéptido,

ésteres de péptido y ésteres de aminoácido.

Tal como apreciará fácilmente el experto en la materia, los ésteres de carbohidrato (particularmente los ésteres de azúcar) presentan una amplia aplicación en la industria alimentaria. Entre otros campos de aplicación se incluyen la cosmética, los productos para el cuidado bucal y material médico. Además, estos compuestos pueden utilizarse como antibióticos, antitumorales, fungicidas e insecticidas. La lípido aciltransferasa según la presente invención es capaz de catalizar la formación de éster de glucosa en un ambiente de alto contenido de agua (figura 51).

Los ésteres producidos según la presente invención encuentran aplicación en los campos siguientes:

cosmética: incluyendo emulsiones de aceite esencial (o/w, HLB 16-18), emulsiones de aceite de parafina, o/w, HLB 10-14; emulsiones de ácido esteárico; emulsiones de cera, o/w, HLB 14-16; emulsiones de lanolina, HLB 12-14; emulsiones de silicona; pastas dentífricas, o/w; baños de espuma, o/w, HLB 14-18; loción capilar.

Preparaciones farmacéuticas: incluyendo en emulsiones farmacológicas; bases de pomada; compuestos para supositorios, w/o; encapsulado; preparación para inyección.

Agricultura: incluyendo en la mejora de suelos; como aditivo fertilizante; como limpiadores de uso general; limpiadores para frutas y hortalizas; limpiadores para recipientes recolectores de leche.

Protección de cultivos: incluyendo en insecticidas de origen natural, hidrocarburos clorados, y 140; ésteres de ácido fosfórico o/w, HLB 10-14; fungicidas, o/w; herbicidas, o/w.

Industria alimentaria: incluyendo en pan y pasteles; chocolate; prevención de la eflorescencia de las grasas, w/o, HLB 5-10; glaseado de azúcar, o/w, HLB 14-16; ablandadores para caramelos y goma de mascar, w/o, HLB 2-4; prevención de la pegajosidad, w/o, HLB 2-4; aditivos de helados, w/o, LB 4-6; humectado de leche y levadura en polvo, w/o, HLB 9-11; crema de vainilla en polvo, w/o, HLB 2-4; en la industria de las bebidas; en frutas y hortalizas; en saborizantes, w/o y o/w, HLB 10-12; en carne, ensalada u otras salsas aromatizantes, o/w; en pigmentos alimentarios, w/o, HLB 2-4; o/w, HLB 8-18; en inhibidores de espumas.

El beneficio de utilizar ésteres de proteína-ácido graso, ésteres de hidroxíácido y ésteres de carbohidrato producidos según la presente invención, a modo de emulsionantes en aplicaciones alimentarias es que son componentes inocuos compatibles con los alimentos que resultan más fácilmente biodegradables que otros ésteres de ácidos grasos etoxilados de tipo emulsionante utilizados convencionalmente, por ejemplo. De esta manera, estos emulsionantes resultan de utilización más ecológico tanto en la industria alimentaria como en la industria no alimentaria.

En una forma de realización, el éster de microtecnica, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T y/o éster de cortalcerona, pueden funcionar a modo de agente antimicrobiano. Alternativamente, o adicionalmente, el éster de microtecnica, el éster de ascopirona P, el éster de ascopirona T y/o el éster de cortalcerona, pueden funcionar como antioxidante y/o emulsionante.

En una forma de realización, los métodos o usos de la presente invención pueden aplicarse a la producción de emulsionante para la utilización en formulaciones farmacológicas, particularmente en la producción de formulaciones de liberación controlada de ingredientes activos, en las que el ingrediente activo se acila utilizando la lípido aciltransferasa. Dichas formulaciones de liberación lenta resultan particularmente útiles para composiciones farmacéuticas administradas oralmente, en las que la hidrólisis gradual del éster en el tracto digestivo proporciona la administración gradual del ingrediente activo. Dichas composiciones aciladas podrían utilizarse adicionalmente para una formulación subcutánea o intravenosa.

En otra forma de realización, los métodos o usos de la presente invención pueden aplicarse a la producción de catalizadores de transferencia de fases para la transferencia de sales en una solución de solventes orgánicos, por ejemplo en una reacción orgánica. Por ejemplo, la transferencia de un grupo acilo a un aceptor catiónico apropiado, tal como un hidroxíácido (ácido cítrico), o alternativamente con un grupo aceptor aniónico, tal como hidroxiaminas, puede producir catalizadores de transferencia de fases para la transferencia de sales a una solución de solventes orgánicos.

En otra forma de realización, pueden utilizarse los métodos de la presente invención para producir profármacos éster de compuestos farmacéuticos con baja disponibilidad biológica y/o baja solubilidad, por ejemplo agentes antivíricos como el aciclovir y el ganciclovir. El método podría utilizarse además para otros compuestos medicinales con un grupo hidroxilo libre, por ejemplo un grupo hidroxilo primario, secundario o terciario.

Preferentemente, el éster producido según la presente invención se utiliza en una formulación farmacéutica.

Preferentemente, el éster producido según la presente invención se utiliza en un producto cosmético y/o de higiene personal.

Preferentemente, el éster producido según la presente invención se utiliza en un producto alimentario y/o en un pienso.

- 5 El método según la presente invención puede ser una etapa en el procedimiento de fabricación de uno o más de entre un compuesto farmacéutico, un cosmético, un producto de higiene personal, un producto alimenticio o un pienso.

Ventajas

- 10 Una ventaja del método según la presente invención es que resulta en la preparación de un éster de hidroxácido sin necesidad de utilizar solventes orgánicos. De esta manera, la presente invención permite reducir o eliminar la utilización de solventes orgánicos. Lo anterior presenta muchas ventajas, por ejemplo en la reducción de los costes de producción en la reducción de la exposición humana y/o ambiental a solventes orgánicos y en la simplificación del procedimiento de producción.

- 15 En la producción de ésteres para aplicaciones alimentarias resulta particularmente ventajoso utilizar lípidos y no ácidos grasos debido a que no resulta necesario eliminar los lípidos presentes en exceso ya que estos pueden formar parte del ítem alimentario en el que se utiliza el producto de reacción. Por otra parte, resultaría necesario eliminar los ácidos grasos libres presentes en exceso debido a que estos resultarían perjudiciales para la mayoría de productos alimentarios.

Aislamiento

- 25 En un aspecto, preferentemente el polipéptido o proteína para la utilización en la presente invención se encuentra en una forma aislada. El término "aislado" se refiere a que la secuencia se encuentra por lo menos sustancialmente libre de por lo menos un componente adicional con el que la secuencia se encuentra naturalmente asociado en la Naturaleza y tal como se encuentra en la Naturaleza.

- 30 En un aspecto, preferentemente el producto de bioconversión según la presente invención, por ejemplo el éster de carbohidrato y/o el éster de proteína y/o el éster de subunidad de proteína y/o el éster de hidroxácido, se aísla de la mezcla de reacción. El término "aislado" se refiere a que el producto de bioconversión se encuentra por lo menos sustancialmente libre de por lo menos un componente adicional con el que el producto de bioconversión se encuentra asociado durante la reacción de bioconversión.

- 35 Purificación
- En un aspecto, preferentemente el polipéptido o proteína para la utilización en la presente invención se encuentra en una forma purificada. El término "purificado" se refiere a que la secuencia se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo en una pureza de por lo menos aproximadamente 51%, o de por lo menos aproximadamente 75%, o de por lo menos aproximadamente 80%, o de por lo menos aproximadamente 90%, o de por lo menos aproximadamente 95% o de por lo menos aproximadamente 98%.

- 45 En un aspecto, preferentemente el producto de bioconversión producido según la presente invención, por ejemplo el éster de carbohidrato y/o el éster de proteína y/o el éster de subunidad de proteína y/o el éster de hidroxácido, se purifica a partir de la mezcla de reacción y por lo tanto se encuentra en una forma purificada. El término "purificado" se refiere a que el producto de bioconversión se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo con una pureza de por lo menos aproximadamente 51%, o de por lo menos aproximadamente 75%, o de por lo menos aproximadamente 80%, o de por lo menos aproximadamente 90%, o de por lo menos aproximadamente 95%, o de por lo menos aproximadamente 98%.

Composiciones farmacéuticas

- 55 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el producto de la presente invención y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de los mismos).

- 60 Las composiciones farmacéuticas puede estar destinadas a la utilización humana o animal en medicina humana o veterinaria y típicamente comprenden uno o más de un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los portadores o diluyentes aceptables para el uso terapéutico son bien conocidos de la técnica farmacéutica y se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro, editor, 1985). La elección de portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender a modo de portador, excipiente o diluyente, o adicionalmente a los mismos, cualquier ligante o ligantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento y agente o agentes solubilizadores.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, pigmentos e incluso saborizantes en la composición farmacéutica. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

5 Puede haber diferentes requisitos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de administración. A título de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para la administración utilizando una minibomba o mediante una vía mucosa, por ejemplo en forma de pulverización nasal o aerosol para inhalación o solución ingerible, o parenteralmente en la que la composición se formula en una forma inyectable para la administración mediante, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede diseñarse para la administración por varias rutas.

15 En el caso de que el agente deba administrarse mucosalmente a través de la mucosa gastrointestinal, debe poder permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

20 En caso apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inhalación, en forma de supositorio o pesario, tópicamente en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvos para uso externo, mediante la utilización de un parche en la piel, oralmente en forma de tabletas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsula u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo intravenosa, intramuscular o subcutáneamente. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse óptimamente en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de tabletas o pastillas que pueden formularse de un modo convencional.

Clonación de una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido según la presente invención

30 Una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria o un polipéptido que resulte adecuado para la modificación puede aislarse a partir de cualquier célula u organismo que produzca dicho polipéptido. Son bien conocidos de la técnica diversos métodos para el aislamiento de secuencias de nucleótidos.

35 Por ejemplo, puede construirse una biblioteca de ADN genómico y/o ADNc utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce el polipéptido. En el caso de que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sea conocida, pueden sintetizarse sondas oligonucleótidas marcadas y utilizarse para identificar los clones codificantes de polipéptido de la biblioteca genómica preparada a partir del organismo. Alternativamente, podría utilizarse una sonda oligonucleótida marcada que contuviese secuencias homólogas a otro gen de polipéptido conocido, con el fin de identificar los clones codificantes de polipéptido. En este último caso, se utilizan condiciones de hibridación y de lavado de baja astringencia.

45 Alternativamente, podrían identificarse los clones codificantes de polipéptido mediante la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando las bacterias negativas para el enzima con la biblioteca de ADN genómico resultante, y después sembrando en placa las bacterias transformadas sobre agar que contiene el enzima inhibido por el polipéptido, permitiendo de esta manera identificar los clones que expresan el polipéptido.

50 En todavía una alternativa adicional, la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido puede prepararse sintéticamente mediante métodos estándares establecidos, por ejemplo el método de fosforamidita descrito por Beucage S.L. *et al.*, Tetrahedron Letters 22:1859-1869, 1981, o el método descrito por Matthes *et al.*, EMBO J. 3:801-805, 1984. En el método de fosforamidita, se sintetizaron oligonucleótidos, por ejemplo en un sintetizador automático de ADN, se purificaron, se hibridaron, se ligaron y se clonaron en vectores apropiados.

55 Las secuencias de nucleótidos puede ser de origen genómico y sintético mixto, de origen mixto sintético y de ADNc, o de origen mixto genómico y de ADNc, preparadas mediante ligación de fragmentos de origen sintético, genómicos o de ADNc (según resulte apropiado) de acuerdo con técnicas estándares. Cada fragmento ligado corresponde a diversas partes de la secuencia de nucleótidos completa. La secuencia de ADN también puede prepararse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos, por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 4.683.202 o en Saiki R.K. *et al.* (Science 239:487-491, 1988).

Secuencias de nucleótidos

65 La presente invención también comprende secuencias de nucleótidos codificantes de polipéptidos que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria. La expresión "secuencia de nucleótidos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia oligonucleótido o a una secuencia polinucleótida, y a una

variante, homólogos, fragmentos y derivados de los mismos (tal como partes de los mismos). La secuencia de nucleótido puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser de doble cadena o de una sola cadena, representando la cadena de sentido o la antisentido.

- 5 La expresión "secuencia de nucleótidos" en relación a la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente se refiere a ADN, más preferentemente a ADNc de la secuencia codificante.

En una forma de realización preferente, la secuencia de nucleótidos per se codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente invención no cubre la secuencia de nucleótidos nativa en su ambiente natural en el estado de encontrarse unido a la secuencia o secuencias naturalmente asociadas de la misma que también se encuentran en su ambiente natural. Para mejor referencia, los presentes inventores denominan a esta forma de realización preferente, la "secuencia de nucleótidos no nativa". A este respecto, la expresión "secuencia de nucleótidos nativa" se refiere a una secuencia de nucleótidos completa que se encuentra en su ambiente natural y en el estado de encontrarse operativamente ligada a un promotor completo con el que se encuentra naturalmente asociado, encontrándose también el promotor en su ambiente nativo. De esta manera, el polipéptido de la presente invención puede ser expresado por una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo pero en el que la secuencia de nucleótidos no se encuentra bajo el control del promotor con el que se encuentra naturalmente asociado dentro de dicho organismo.

20 Preferentemente, el polipéptido no es un polipéptido nativo. A este respecto, la expresión "polipéptido nativo" se refiere a un polipéptido completo que se encuentra en su ambiente natural y en el caso de que haya sido expresado por su secuencia de nucleótidos nativa.

Típicamente, la secuencia de nucleótidos codificante de polipéptidos que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria se prepara utilizando técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una forma de realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos podría sintetizarse, en su totalidad o en parte, utilizando métodos químicos bien conocidos de la técnica (ver Caruthers M.H. *et al.*, Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-23, 1980, y Horn T. *et al.*, Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980).

30 Evolución molecular

Tras aislar una secuencia de nucleótidos codificante de enzima, o tras identificar una secuencia de nucleótidos codificante de un enzima putativo, puede resultar deseable modificar la secuencia de nucleótidos seleccionada, por ejemplo puede resultar deseable mutar la secuencia con el fin de preparar un enzima según la presente invención.

Pueden introducirse mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

40 Se da a conocer un método adecuado en Morinaga *et al.* (Biotechnology 2:646-649, 1984). Otro método para introducir mutaciones en secuencias de nucleótidos codificantes de enzima se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry 180:147-151, 1989).

En lugar de la mutagénesis sitio-dirigida, tal como se ha indicado anteriormente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente, por ejemplo utilizando un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria mediante PCR Diversify de Clontech. La patente EP 0583265 se refiere a métodos de optimización de la mutagénesis basada en PCR, que también puede combinarse con la utilización de análogos de ADN mutagénicos tales como los indicados en la patente EP 0.866.796. Las tecnologías de PCR propenso a errores resultan adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con características preferentes. La patente WO 0206457 se refiere a la evolución molecular de lipasas.

Un tercer método para obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias de nucleótidos no idénticas, mediante la utilización de cualquier grupo de enzimas de restricción o un enzima tal como Dnasa I, y reensamblar las secuencias de nucleótidos completas codificantes de proteínas funcionales. Alternativamente, puede utilizarse una o múltiples secuencias de nucleótidos no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblado de la secuencia de nucleótidos completa. La reorganización del ADN y las tecnologías de reorganización de familias resultan adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con características preferentes. Pueden encontrarse métodos adecuados para llevar a cabo la "reorganización" en las patentes EP 0752008, 1138763 y 1103606. La reorganización también puede combinarse con otras formas de mutagénesis de ADN, tal como se describe en las patentes US nº 6.180.406 y WO 01/34835.

De esta manera, resulta posible producir numerosas mutaciones sitio-dirigidas o aleatorias en una secuencia de nucleótidos, *in vivo* o *in vitro*, y posteriormente cribar para una funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por diversos medios. Mediante la utilización de métodos de recombinación *in silico* y mediados externamente (ver las patentes WO 00/58517, US nº 6.344.328 y US nº 6.361.974), por ejemplo, puede llevarse a cabo la evolución molecular en la que la variante producida conserva una homología muy baja con enzimas o proteínas conocidos.

Este tipo de variantes obtenidas de esta manera presentan una analogía estructural significativa respecto a enzimas transferasas conocidos, pero presentan una homología de la secuencia de aminoácidos muy baja.

5 A título de ejemplo no limitativo, además, pueden recombinarse mutaciones o variantes naturales de una secuencia polinucleótido con las mutaciones de tipo salvaje u otras o con variantes naturales, con el fin de producir nuevas variantes. Estas nuevas variantes también pueden cribarse para una funcionalidad mejorada del polipéptido codificado.

10 La aplicación de los métodos de evolución molar anteriormente indicados y otros similares, permite la identificación y selección de variantes de los enzimas de la presente invención que presentan características preferentes sin ningún conocimiento anterior de la estructura o función de la proteína, y permite la producción de mutaciones o variantes no predecibles aunque beneficiosas. Existen numerosos ejemplos en la técnica de la aplicación de la evolución molecular a la optimización o alteración de la actividad enzimática, incluyendo dichos ejemplos, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: expresión y/o actividad optimizadas en una célula huésped o *in vitro*, actividad enzimática incrementada, especificidad de sustrato y/o de producto alteradas, estabilidad enzimática o estructural incrementadas o reducidas, actividad/especificidad enzimáticas alteradas bajo condiciones ambientales preferentes, por ejemplo temperatura, pH y sustrato.

20 Tal como resultará evidente para el experto en la materia, mediante la utilización de herramientas de evolución molecular, puede alterarse un enzima para mejorar la funcionalidad del mismo.

25 Convenientemente, la lípido aciltransferasa utilizada en la invención puede ser una variante, es decir, puede contener por lo menos una sustitución, delección o adición de aminoácido, en comparación con un enzima parental. Los enzimas variantes conservan una homología de por lo menos 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% con el enzima parental. Entre los enzimas parentales adecuados puede incluirse cualquier enzima con actividad de esterasa o lipasa. Preferentemente, el enzima parental se alinea con la secuencia de consenso pfam00657.

30 En una forma de realización preferible, un enzima lípido aciltransferasa variante conserva o incorpora por lo menos uno o más de los residuos aminoácidos de la secuencia de consenso pfam00657 presentes en los bloques GDSx, GANDY y HPT.

35 Pueden mutarse algunos enzimas, tales como lipasas con poca o ninguna actividad de lípido aciltransferasa en un ambiente acuoso utilizando herramientas de evolución molecular para introducir o incrementar la actividad de transferasa, produciendo de esta manera un enzima lípido aciltransferasa con actividad de transferasa significativa que resulte adecuado para la utilización en las composiciones y métodos de la presente invención.

40 Convenientemente, la lípido aciltransferasa para la utilización en la invención puede ser una variante con actividad enzimática incrementada sobre lípidos polares, preferentemente fosfolípidos y/o glicolípidos en comparación con el enzima parental. Preferentemente, dichas variantes también presentan una actividad baja o nula sobre los lípidos polares. La actividad incrementada sobre los lípidos polares, fosfolípidos y/o glicolípidos puede ser el resultado de la actividad de hidrólisis y/o transferasa o de una combinación de ambas.

45 Las lípido aciltransferasas variantes para la utilización en la invención pueden presentar una actividad reducida sobre los triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos, en comparación con el enzima parental.

Convenientemente, el enzima variante puede no presentar ninguna actividad sobre los triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos.

50 Alternativamente, el enzima variante para la utilización en la invención puede presentar una actividad incrementada sobre los triglicéridos y/o también puede presentar una actividad incrementada sobre uno o más de los siguientes: lípidos polares, fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina, glucolípidos, digalactosil-monoglicérido, monogalactosil-monoglicérido.

55 Se conocen variantes de las lípido aciltransferasas, y una o más de estas variantes puede resultar adecuada en los métodos y usos de la invención. Por ejemplo, se describen variantes de lípido aciltransferasas en las referencias siguientes:

60 Hilton S., Buckley J.T. Studies on the reaction mechanism of a microbial lipase/acyltransferase using chemical modification and site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 266(2):997-1000, 15 de junio de 1991.

Robertson D.L., Hilton S., Wong K.R., Koepke A., Buckley J.T. Influence of active site and tyrosine modification on the secretion and activity of the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase. J. Biol. Chem. 269(3):2146-50, 21 de enero de 1994.

65 Brumlik M.J., Buckley J.T. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*.

J. Bacteriol. 178(7):2060-4, abril de 1996.

5 Peelman F., Vinaimont N., Verhee A., Vanloo B., Verschelde J.L., Labeur C., Seguret-Mace S., Duverger N., Hutchinson G., Vandekerckhove J., Tavernier J., Rosseneu M. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. Protein Sci. 7(3):587-99, marzo de 1998.

Secuencias de aminoácidos

10 La presente invención también comprende secuencias de aminoácidos de polipéptidos que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "péptido".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse a partir de una fuente adecuado, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante la utilización de técnicas de ADN recombinante.

20 Convenientemente, las secuencias de aminoácidos pueden obtenerse a partir de los polipéptidos aislados que se enseñan en la presente memoria, mediante técnicas estándares.

Un método adecuado para determinar las secuencias de aminoácidos a partir de los polipéptidos aislados es el siguiente:

25 puede liofilizarse polipéptido purificado y disolverse 100 µg del material liofilizado en 50 µl de una mezcla de urea 8 M e hidrogenocarbonato amónico 0,4 M, pH 8,4. La proteína disuelta puede desnaturalizarse y reducirse durante 15 minutos a 50°C, seguido de la cobertura con nitrógeno y la adición de 5 µl de ditiotreitól 45 mM. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, pueden añadirse 5 µl de yodoacetamida 100 mM para derivatizar los residuos cisteína durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad bajo nitrógeno.

30 Pueden añadirse 135 µl de agua y 5 µg de endoproteinasa Lys-C en 5 µl de agua a la mezcla de reacción anteriormente indicada y llevar a cabo la digestión a 37°C bajo nitrógeno durante 24 horas.

35 Los péptidos resultantes pueden separarse mediante HPLC de fase inversa en una columna VYDAC C18 (0,46x15 cm; 10 µm; The Separation Group, California, USA) utilizando el solvente A: TFA al 0,1% en agua y solvente B: TFA al 0,1% en acetonitrilo. Pueden recromatografiarse una selección de los péptidos en una columna Develosil C18 utilizando el mismo sistema de solventes, previamente a la secuenciación N-terminal. La secuenciación puede realizarse utilizando un secuenciador 476A de Applied Biosystems utilizando ciclos rápidos de pulsos líquidos siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, USA).

Identidad de secuencias u homología de secuencias

45 La presente invención también comprende la utilización de secuencias que presentan un grado de identidad de secuencia o de homología de secuencia con una o más secuencias de aminoácidos de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria o de cualquier secuencia de nucleótidos codificante de dicho polipéptido (en lo sucesivo en la presente memoria denominado "secuencia o secuencias homólogas"). En la presente memoria, el término "homólogo" se refiere a una entidad que presenta una determinada homología con las secuencias de aminoácidos de la invención y las secuencias de nucleótidos de la invención. En la presente memoria, el término "homología" puede considerarse equivalente al término "identidad".

50 La secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos homóloga debería proporcionar y/o codificar un polipéptido que conserve la actividad funcional y/o que incremente la actividad del enzima.

55 En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 75%, 85% ó 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95% ó 98% idéntica a la secuencia de la invención. Típicamente, los homólogos comprenden los mismos sitios activos, etc. que la secuencia de aminoácidos de la invención. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos aminoácidos que presentan propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención resulta preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

60 En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede presentar una identidad de secuencia de por lo menos 75%, 85% ó 90%, preferentemente de por lo menos 95% ó 98% respecto a una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido de la presente invención (la secuencia de la invención). Típicamente, los homólogos comprenden las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc. que la secuencia de la invención. Aunque también puede considerarse la homología en términos de similitud (es

decir, residuos aminoácidos que presentan propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención resulta preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

5 Pueden llevarse a cabo comparaciones de homología visualmente, o más habitualmente, con ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

10 Puede calcularse el % de homología a lo largo de secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y se compara directamente cada aminoácido en una secuencia con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, residuo a residuo. Esto se denomina alineación "sin huecos". Típicamente, estas alineaciones sin huecos se llevan a cabo únicamente a lo largo de un número relativamente corto de residuos.

15 Aunque es un método muy simple y consistente, no considera que, por ejemplo, en un par de secuencias de otro modo idénticas, una inserción o delección provocará que los residuos aminoácidos siguientes se encuentren desalineados, resultando potencialmente de esta manera en una gran reducción del % de homología al llevar a cabo una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineaciones óptimas que tienen en consideración posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se consigue mediante la inserción de "huecos" en la alineación de secuencias para intentar maximizar la homología local.

20 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones de hueco" a cada hueco que se produce en la alineación de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencias con el mínimo de huecos, lo que refleja un grado de relación más alto entre las dos secuencias que se comparan, alcanzará una puntuación más alta que una con muchos huecos. Típicamente se utilizan "costes de hueco afín" que imponen un coste relativamente alto a la existencia de un hueco y una penalización menor para cada residuo posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos utilizado más comúnmente. Evidentemente las penalizaciones de hueco elevadas producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de programas de alineación permiten modificarse las penalizaciones de hueco. Sin embargo, resulta preferente utilizar los valores por defecto al utilizar dicho software de comparación de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el paquete Bestfit del GCG Wisconsin, la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

35 Por lo tanto, el cálculo del % de homología máximo requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en consideración las penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete Bestfit del GCG Wisconsin (Devereux *et al.*, Nucl. Acids Research 12:387, 1984). Entre los ejemplos de otros programas que pueden llevar a cabo comparaciones entre secuencias se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el paquete BLAST (ver Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 4ª edición, capítulo 18, 1999), FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 403-410, 1990) y el grupo GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA se encuentran disponibles para las búsquedas fuera de línea y en línea (ver Ausubel *et al.*, páginas 7-58 a 7-60, 1999). Sin embargo, para algunas aplicaciones, resulta preferente utilizar el programa Bestfit del GCG. También se encuentra disponible una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, para comparar secuencias de proteína y de nucleótidos (ver FEMS Microbiol. Lett. 174(2):247-50, 1999; FEMS Microbiol. Lett. 177(1):187-8, 1999, y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

45 Aunque el % final de homología puede medirse en términos de identidad, el procedimiento de alineación mismo típicamente no se basa en una comparación de pareja de todo o nada. Por el contrario, generalmente se utiliza una matriz de puntuaciones escaladas de similitud que asigna puntuaciones a cada comparación de pareja basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. Los programas del GCG Wisconsin generalmente utilizan los valores por defecto públicos o una tabla de comparaciones de símbolos adaptada, en caso de que se proporcione (ver el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, resulta preferente utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otros programas, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

55 Alternativamente, pueden calcularse porcentajes de homología utilizando la función de alineaciones múltiples en DNASIS™ (Hitachi Software), basada en un algoritmo análogo a CLUSTAL (Higgins D.G. y Sharp P.M., Gene 73(1):237-244, 1988).

60 Tras producir el programa una alineación óptima, resulta posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El programa típicamente realiza lo anterior como parte de la comparación de secuencias y genera un residuo numérico.

65 Las secuencias también pueden presentar delecciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse basadas en la similitud de la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos, con la condición de que se conserve la

actividad secundaria de unión de la sustancia. Por ejemplo, entre los aminoácidos con carga negativa se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; entre los aminoácidos con carga positiva se incluyen lisina y arginina; y entre los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que presentan valores de hidrofiliicidad similares se incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

5 Pueden realizarse sustituciones conservadoras, por ejemplo según la Tabla, posteriormente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse mutuamente:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares sin carga	C S T M
		N Q
	Polares con carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

10 La presente invención también comprende la sustitución homóloga (los términos sustitución y reemplazamiento se utilizan en la presente memoria para referirse al intercambio de un residuo aminoácido existente por un residuo alternativo) que puede producirse, es decir, la sustitución de igual por igual, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede producirse la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuo por otra, o que alternativamente implique la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ácido diaminobutírico ornitina (en lo sucesivo denominada B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominada O), pirililalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

15 También pueden realizarse sustituciones por aminoácidos no naturales.

20 Entre las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluirse grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre dos residuos aminoácidos cualesquiera de la secuencia, incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos glicina o β -alanina. Una forma adicional de variación implica la presencia de uno o más residuos aminoácidos en forma peptoide, que será bien entendida por el experto en la materia. Para evitar dudas, la expresión "la forma peptoide" se utiliza para referirse a residuos aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente de carbono α se encuentra en el átomo de nitrógeno del residuo y no en el carbono α . Son conocidos de la técnica procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoide, por ejemplo Simon R.J. *et al.*, PNAS 89(20):9367-9371, 1992, y Horwell D.C., Trends Biotechnol. 13(4):132-134, 1995.

25 Las secuencias de nucleótidos para la utilización en la presente invención o codificantes de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria pueden incluir en las mismas nucleótidos sintéticos o modificados. Son conocidas de la técnica varios tipos diferentes de modificación de los oligonucleótidos. Entre ellos se incluyen los esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos indicadas en la presente memoria pueden modificarse mediante cualquier método disponible de la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de incrementar la actividad *in vivo* o el tiempo de vida de las secuencias de nucleótidos.

30 La presente invención también comprende la utilización de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias comentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. En el caso de que la secuencia sea complementaria a un fragmento de las mismas, la secuencia puede utilizarse a modo de sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

35 Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero que se encuentran comprendidos dentro del alcance de la misma pueden obtenerse de varias maneras. Pueden obtenerse otras variantes de las secuencias indicadas en la presente memoria, por ejemplo mediante sondeo de bibliotecas de ADN preparadas a partir de un abanico de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos víricos/bacterianos o celulares, particularmente homólogos celulares presentes en célula de mamífero (por ejemplo células de rata, ratón, bovinas y de primate), y dichos homólogos y fragmentos de los mismos en general son capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse mediante sondeo de bibliotecas de ADNc preparadas a partir de bibliotecas de ADN genómico de otras especies animales, y el sondeo de dichas bibliotecas con sondas que comprenden la totalidad o parte de cualquiera de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos, bajo condiciones de astringencia intermedia a alta. Resultan aplicables consideraciones similares a la obtención de homólogos específicos y variantes alélicas de las secuencias de polipéptido o de nucleótidos de la invención.

También pueden obtenerse variantes y homólogos de cepa/especie utilizando PCR degenerada, que utiliza cebadores diseñados con diana en las secuencias dentro de las variantes y homólogos codificantes de secuencias conservadas de aminoácidos situadas en el interior de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, mediante alineación de las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Pueden llevarse a cabo alineaciones de secuencias utilizando programas informáticos conocidos de la técnica. Por ejemplo, se utiliza ampliamente el programa PileUp del GCG Wisconsin.

Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contienen una o más posiciones degeneradas y se utilizan bajo condiciones de astringencia inferiores a las utilizadas para el clonado de secuencias con cebadores únicos de secuencia contra secuencias conocidas.

Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis sitio-dirigida de secuencias caracterizadas. Esto puede resultar útil en el caso de que resulten necesarios cambios silenciosos de la secuencia de codones para optimizar las preferencias de codones para una célula huésped particular en la que se están expresando las secuencias polinucleótidas. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de polipéptido de restricción, o para alterar las propiedades o funciones de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención pueden utilizarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con un marcaje indicador, por medios convencionales utilizando marcajes radioactivos o no radioactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos presentarán una longitud de por lo menos 15, preferentemente de por lo menos 20, por ejemplo por lo menos 25, 30 ó 40 nucleótidos, y también se encuentran comprendidos por el término polinucleótidos de la invención tal como se utiliza en la presente memoria.

Pueden producirse polinucleótidos tales como los polinucleótidos y sondas de ADN según la invención recombinantemente, sintéticamente o por cualquier medio disponible para el experto en la materia. También pueden clonarse mediante técnicas estándares.

En general, los cebadores se producen por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácidos nucleicos deseada, nucleótido a nucleótido. Las técnicas para conseguir lo anterior utilizando técnicas automáticas se encuentran fácilmente disponibles en la técnica.

Generalmente se producen polinucleótidos más largos por medios recombinantes, por ejemplo utilizando una técnica de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Ésta implica construir una pareja de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) flanqueantes de una región de la secuencia con diana en el lípido la cual es la que se desea clonar, poniendo en contacto los cebadores con ARNm o ADNc obtenido a partir de una célula animal o humana, realizando una reacción en cadena de polimerasa bajo condiciones que produzcan la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (por ejemplo mediante purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperando el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para que contengan sitios de reconocimiento de enzima de restricción adecuados, de manera que pueda clonarse el ADN amplificado en un vector de clonación adecuado.

Hibridación

La presente invención también comprende secuencias que son complementarias de las secuencias de la presente invención, o secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias de las mismas.

El término "hibridación" tal como se utiliza en la presente memoria incluye "el procedimiento por el que una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria mediante apareamiento de bases", así como el procedimiento de amplificación llevado a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de polimerasa (PCR).

La presente invención también comprende la utilización de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse con las secuencias que son complementarias a las secuencias de la invención comentadas en la presente memoria, o cualquier derivado o fragmento de las mismas.

La presente invención también comprende secuencias que son complementarias de las secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos comentadas en la presente memoria.

Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m) del complejo de unión a nucleótidos, tal como se enseña en Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, vol. 152, Academic Press, San Diego, CA, 1987), y proporcionan una "astringencia" definida, tal como se explica posteriormente.

La astringencia máxima típicamente se produce a una temperatura de aproximadamente $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C inferiores a la T_m de la sonda); una astringencia elevada a aproximadamente 5°C a 10°C menos que la T_m ; la astringencia intermedia a aproximadamente 10°C a 20°C menos de la T_m ; y una astringencia baja a aproximadamente 20°C a 25°C menos de la T_m . Tal como entenderá el experto en la materia, puede utilizarse una hibridación a astringencia máxima para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas, mientras que puede utilizarse una hibridación a astringencia intermedia (o baja), para identificar secuencias polinucleótidas similares o relacionadas.

Preferentemente, la presente invención comprende secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridarse bajo condiciones de elevada astringencia o bajo condiciones de astringencia intermedia a secuencias de nucleótidos codificantes de polipéptidos que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

Más preferentemente, la presente invención comprende secuencias que son complementarias de secuencias que son capaces de hibridarse bajo condiciones de elevada astringencia (por ejemplo 65°C y $0,1\times\text{SSC}$ { $1\times\text{SSC}=\text{NaCl}$ $0,15\text{ M}$, citrato sódico $0,015\text{ M}$, pH $7,0$ }) a secuencias de nucleótidos codificantes de polipéptidos que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos comentadas en la presente memoria (incluyendo secuencias complementarias a las comentadas en la presente memoria).

La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos comentadas en la presente memoria (incluyendo secuencias complementarias a las comentadas en la presente memoria).

También se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención secuencias polinucleótidas que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos comentadas en la presente memoria bajo condiciones de astringencia intermedia a máxima.

En un aspecto preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos comentadas en la presente memoria, o el complemento de las mismas, bajo condiciones astringentes (por ejemplo 50°C y $0,2\times\text{SSC}$).

En un aspecto más preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse a las secuencias de nucleótidos comentadas en la presente memoria, o al complemento de las mismas, bajo condiciones de elevada astringencia (por ejemplo 65°C y $0,1\times\text{SSC}$).

Expresión de polipéptidos

Puede incorporarse una secuencia de nucleótidos para la utilización en la presente invención o para codificar un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria, en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de polipéptido, en una célula huésped compatible y/o a partir de la misma. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulos. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes de los indicados anteriormente.

El polipéptido producido por una célula recombinante huésped mediante expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizado. Las secuencias codificantes puede diseñarse con secuencias de señal que dirigen la secreción de las secuencias codificantes de la secuencia a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

Vector de expresión

La expresión "vector de expresión" se refiere a un constructo capaz de la expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma del organismo. El término "incorporado" preferentemente cubre la incorporación estable en el genoma.

La secuencia de nucleótidos de la presente invención o codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede encontrarse presente en un vector, en el que la secuencia de nucleótidos se encuentra operablemente ligada a secuencias reguladoras, de manera que las secuencias reguladoras son capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por parte de un organismo huésped adecuado, es decir, el vector es un vector de expresión.

Los vectores de la presente invención pueden transformarse en una célula huésped adecuado tal como se describe posteriormente, permitiendo la expresión de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

- 5 La elección de vector, por ejemplo vector plásmido, cósmido, virus o fago, con frecuencia depende de la célula huésped en la que debe introducirse.

Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tales como un gen que proporcione resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede conseguirse mediante cotransformación (tal como se describe en la patente WO 91/17243).

Pueden utilizarse vectores *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN, o utilizarse para transfectar o transformar una célula huésped.

De esta manera, en una forma de realización adicional, la invención proporciona un método de preparación de secuencias de nucleótidos de la presente invención o secuencias de nucleótidos codificantes de polipéptidos que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria, mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos en un vector replicable, la introducción del vector en una célula huésped compatible y el cultivo de la célula huésped bajo condiciones que induzcan la replicación del vector.

El vector puede comprender además una secuencia de nucleótidos que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Son ejemplos de dichas secuencias, los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

25 Secuencias reguladoras

En algunas aplicaciones, una secuencia de nucleótidos para la utilización en la presente invención o una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede unirse operablemente a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por parte de la célula huésped seleccionada. A título de ejemplo, la presente invención cubre un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención operablemente ligada a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

35 La expresión "operablemente ligado" se refiere a la yuxtaposición en la que los componentes indicados se encuentran en una relación que les permite funcionar del modo pretendido. Una secuencia reguladora "operablemente ligada" a una secuencia codificante se encuentra ligada de manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

40 La expresión "secuencias reguladoras" incluye promotores e intensificadores, y otras señales de regulación de la expresión.

El término "promotor" se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo un sitio de unión de ARN polimerasa.

45 La expresión incrementada de la secuencia de nucleótidos codificante del enzima que presenta las propiedades específicas definidas en la presente invención también puede conseguirse mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo un promotor, un líder secretorio y regiones terminadoras.

50 Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ligarse operablemente a por lo menos un promotor.

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en un huésped bacteriano, fúngico o de levadura son bien conocidos de la técnica.

55 Constructos

El término "constructo", que es sinónimo de términos tales como "conjugado", "casete" e "híbrido", incluye una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria para la utilización según la presente invención, directa o indirectamente unido a un promotor. Un ejemplo de una unión indirecta es la provisión de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia de intrón, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, en posición intermedia entre el promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Análogamente, el término "fusionado" en relación a la presente invención incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, las expresiones no cubren la combinación natural de secuencia de nucleótidos codificante de la proteína habitualmente asociada al promotor del gen de tipo salvaje y en el caso de que ambos se encuentren en su ambiente natural.

El constructo incluso puede contener o expresar un marcador que permita la selección del constructo genético.

5 En algunas aplicaciones, preferentemente el constructo comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos de la presente invención o una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria operablemente ligado a un promotor.

Células huésped

10 La expresión "célula huésped" en relación a la presente invención incluye cualquier célula que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria o un vector de expresión indicado anteriormente y que se utiliza en la producción recombinante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

15 De esta manera, una forma de realización adicional de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos de la presente invención, o una secuencia de nucleótidos que expresa un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria. Las células se seleccionan para que resulten compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, células procariontes (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales. Preferentemente, las células huésped no son células humanas.

20 Son ejemplos de organismos huésped bacterianos adecuados, las bacterias Gram-negativas o Gram-positivas.

25 Dependiendo de la naturaleza de la secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria, y/o la deseabilidad para el procesamiento adicional de la proteína expresada, pueden resultar preferentes huéspedes eucarióticos tales como levaduras u otros hongos. En general, resultan preferentes las células de levadura respecto a las células fúngicas debido a que resultan más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son pobremente secretadas de la célula de levadura, o en algunos casos no resultan procesadas correctamente (por ejemplo la hiperglicosilación en levaduras). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

30 La utilización de células huésped adecuadas, tales como células huésped de levadura, fúngicas y vegetales, puede permitir la realización de modificaciones post-traduccionales (por ejemplo miristoilación, glucosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosinas, serinas o treoninas) según resulte necesario para proporcionar una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinante de la presente invención.

35 La célula huésped puede ser una cepa deficiente en proteasas o proteasa menos.

Organismo

40 El término "organismo" en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender una secuencia de nucleótidos según la presente invención o una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presente las propiedades específicas definidas en la presente memoria y/o productos obtenidos a partir de la misma.

45 Entre los organismos adecuados pueden incluirse un procarionte, un hongo, una levadura o una planta.

50 La expresión "organismo transgénico" en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria y/o los productos obtenidos a partir de la misma, y/o en el que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria dentro del organismo. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos se incorpora en el genoma del organismo.

55 La expresión "organismo transgénico" no cubre las secuencias de nucleótidos nativas codificantes en su ambiente natural en el caso de que se encuentren bajo el control de su promotor nativo que también se encuentre en su ambiente natural.

60 Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende una cualquiera, o combinaciones, de una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria, constructos definidos en la presente memoria, vectores definidos en la presente memoria, plásmidos definidos en la presente memoria, células definidas en la presente memoria, o los productos de los mismos. Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria bajo el control de un promotor heterólogo.

Transformación de células/organismo huésped

Tal como se ha indicado anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Entre los ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados se incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

Las enseñanzas sobre la transformación de huéspedes procarióticas se encuentran bien documentadas en la técnica; ver, por ejemplo, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). En el caso de que se utilice un huésped procariótico, la secuencia de nucleótidos puede requerir su adecuada modificación antes de la transformación, tal como mediante la eliminación de intrones.

En otra forma de realización, el organismo transgénico puede ser una levadura.

Las células fúngicas filamentosas pueden transformarse utilizando diversos métodos conocidos de la técnica, tales como un procedimiento que implica la formación de un protoplasto y la transformación de los protoplastos seguido de la regeneración de la pared celular de un modo conocido. La utilización de *Aspergillus* como microorganismo huésped se describe en la patente EP 0238023.

Otro organismo huésped puede ser una planta. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales utilizadas para transformar plantas en artículos por Potrykus (Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 42:205-225, 1991) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech, marzo/abril de 1994, 17-27). Pueden encontrarse enseñanzas adicionales en el documento EP-A-0 449 375.

Se presentan enseñanzas generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas en las secciones a continuación.

Trasformación de hongos

Un organismo huésped puede ser un hongo, tal como un hongo filamentosos. Entre los ejemplos de dichos huéspedes adecuados se incluyen cualquier miembro perteneciente a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

Se proporciona una revisión de las enseñanzas sobre la transformación de hongos filamentosos en el documento US-A-5.741.665, que indica que las técnicas estándares para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de hongos son bien conocidos de la técnica. Puede encontrarse una revisión extensiva de las técnicas aplicadas a *N. crassa* en, por ejemplo, Davis y de Serres, Methods Enzymol. 17A:79-143, (1971).

Se proporcionan enseñanzas adicionales sobre la transformación de hongos filamentosos en el documento US-A-5.674.707.

En un aspecto, el organismo huésped puede ser del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Un *Aspergillus* transgénico según la presente invención también puede prepararse siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas de Turner G., 1994 (Vector for genetic manipulation. En: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (editores), *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology*, vol. 29. Elsevier, Amsterdam, 1994, páginas 641 a 666).

Se proporciona una revisión de la expresión génica en los hongos filamentosos en Punt *et al.*, Trends Biotechnol. 20(5):200-6, mayo de 2002, 2002, y en Archer y Peberdy, Crit. Rev. Biotechnol. 17(4):273-306, 1997.

Transformación de levaduras

En otra forma de realización, el organismo transgénico puede ser una levadura.

Se proporciona una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en levaduras en, por ejemplo, Methods Mol. Biol. 49:341-54, 1995, y en Curr. Opin. Biotechnol. 8(5):554-60, octubre 1997.

A este respecto, pueden utilizarse levaduras tales como la especie *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (ver FEMS Microbiol. Rev. 24(1):45-66, 2000) a modo de vehículo para la expresión génica heteróloga.

Se proporciona una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de productos génicos en E. Hinchcliffe E. Kenny ("Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol. 5, 1993, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, editores, 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Para la transformación de levaduras, se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse un *Saccharomyces* transgénico según la presente invención siguiendo las enseñanzas de Hinnen *et al.* (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75:1929, 1978); Beggs J.D. (Nature, London, 275:104, 1978; e Ito H. *et al.* (J. Bacteriology 153:163-168, 1983).

5 Puede seleccionarse un organismo huésped levadura adecuado a partir de las especies de levadura biotecnológicamente relevantes, tales como, aunque sin limitación, especies de levadura tales como *Pichia* sp., *Hansenula* sp. o *Kluyveromyces*, especies de *Yarrowinia* o una especie de *Saccharomyces*, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, o una especie perteneciente a *Schizosaccharomyces*, tal como, por ejemplo la especie *S. pombe*.

Puede utilizarse una cepa de la especie de levadura metilotrófica *Pichia pastoris* a modo de organismo huésped.

10 En una forma de realización, el organismo huésped es una especie de *Hansenula*, tal como *Hansenula polymorpha* (tal como se describe en la patente WO 01/38544).

Las células de levadura transformadas pueden seleccionarse utilizando diversos marcadores selectivos, tales como marcadores auxotróficos, marcadores dominantes de resistencia antibiótica.

15 Transformación de plantas/células vegetales

Un organismo huésped adecuado para la presente invención puede ser una planta. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en artículos por Potrykus (Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:205-225, 1991) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech, marzo/abril de 1994, 17-27) o en la patente WO 01/16308. La planta transgénica puede producir niveles incrementados de ésteres de fitoesterol y ésteres de fitoestanol, por ejemplo.

25 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para la producción de una planta transgénica con niveles incrementados de ésteres de fitoesterol y de ésteres de fitoestanol, que comprende las etapas de transformar una célula vegetal con una lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria (en particular con un vector o constructo de expresión que comprende una lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria), y cultivar una planta a partir de la célula vegetal transformada.

30 Secreción

Con frecuencia resulta deseable que el polipéptido sea secretado del huésped de expresión al medio de cultivo a partir del que puede recuperarse más fácilmente el enzima. Según la presente invención, la secuencia líder de secreción puede seleccionarse según el huésped de expresión deseado. También pueden utilizarse secuencias de señal híbridas dentro del contexto de la presente invención.

35 Son ejemplos típicos de secuencias líder heterólogas de secreción aquéllas originadas del gen de la amiloglucosidasa fúngica (AG) (*glaA*, las dos versiones, de 18 y 24 aminoácidos, por ejemplo de *Aspergillus*), el gen del factor a (de levaduras, por ejemplo de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de la α -amilasa (*Bacillus*).

40 Detección

Se conocen de la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de las secuencias de aminoácidos. Entre los ejemplos se incluyen el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y separación celular activada por fluorescencia (FACS).

El experto en la materia conoce una amplia diversidad de marcajes y técnicas de conjugación, y pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y de aminoácidos.

50 Varias compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran kits comerciales y protocolos para dichos procedimientos.

Entre las moléculas informadoras y marcajes adecuados se incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Entre las patentes que enseñan la utilización de dichos marcajes se incluyen las patentes US-A-3.817.837, US-A-3.850.752, US-A-3.939.350, US-A-3.996.345, US-A-4.277.437, US-A-4.275.149 y US-A-4.366.241.

Además, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes tal como se muestra en la patente US-A-4.816.567.

60 Proteínas de fusión

65 Puede producirse un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria a modo de proteína de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación del mismo. Entre los ejemplos de parejas de proteína de fusión se incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o de activación transcripcional) y la β -galactosidasa. También puede resultar conveniente incluir un sitio de corte

proteolítico entre la pareja de proteína de fusión y la secuencia de interés de la proteína, para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferentemente, la proteína de fusión no perjudica la actividad de la secuencia proteica.

5 Se proporciona una revisión de los sistemas de expresión de fusión génica en *E. coli* en Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):501-6, 1995.

10 En otra forma de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede ligarse a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para el cribado de bibliotecas de péptidos para agentes capaces de afectar a la actividad de la sustancia, puede resultar útil codificar una sustancia quimérica que expresa un epítipo heterólogo que resulta reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

15 A continuación se describe la invención, a título de ejemplo únicamente, haciendo referencia a las figuras y Ejemplos siguientes:

la figura 1 muestra una secuencia de consenso pfam00657 de la versión 6 de la base de datos (SEC ID nº 1),

20 la figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 2) obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480, GI:121051),

la figura 3 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 3) obtenida del organismo *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017),

25 la figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 4) obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (número de acceso de Genbank NP_631558),

30 la figura 5 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 5) obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (número de acceso de Genbank CAC42140),

la figura 6 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 6) obtenida del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso de Genbank P41734),

35 la figura 7 muestra una alineación de secuencias seleccionadas con la secuencia de consenso pfam00657,

40 la figura 8 muestra una alineación de una pareja de SEC ID nº 3 y SEC ID nº 2 que muestra una identidad de secuencia de aminoácidos de 93%. La secuencia de señal se ha subrayado. '+' señala las diferencias. El motivo GDSX que contiene el sitio activo serina 16, y los sitios activos ácido aspártico 116 e histidina 291 se encuentran destacados (ver las regiones sombreadas). Los números después del aminoácido son menos la secuencia de señal,

45 la figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 7) codificante de una lípido aciltransferasa según la presente invención obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila*,

la figura 10 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 8) codificante de una lípido aciltransferasa según la presente invención obtenida del organismo *Aeromonas salmonicida*,

50 la figura 11 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 9) codificante de una lípido aciltransferasa según la presente invención obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso de Genbank NC_003888.1:8327480..8328367),

la figura 12 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 10) codificante de una lípido aciltransferasa según la presente invención obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso de Genbank AL939131.1:265480..266367),

55 la figura 13 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 11) codificante de una lípido aciltransferasa según la presente invención obtenida del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso de Genbank Z75034),

60 la figura 14 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 12) obtenida del organismo *Ralstonia* (número de acceso de Genbank AL646052),

la figura 15 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 13) codificante de una lípido aciltransferasa según la presente invención obtenida del organismo *Ralstonia*,

65 la figura 16 muestra la secuencia SEC ID nº 20. Scoe1, código de acceso de NCBI nº CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

la figura 17 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 21 codificante de la proteína código de acceso de NCBI CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

5 la figura 18 muestra un aminoácido mostrado como SEC ID nº 22. Scoe2, proteína de código de acceso de NCBI CAC01477.1 GI:9716139, proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

la figura 19 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 23 codificante de Scoe2, proteína de código de acceso de NCBI CAC01477.1 GI:9716139, proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

10 la figura 20 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 24), Scoe3, proteína código de acceso de NCBI CAB88833.1 GI:7635996, proteína secretada putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

15 la figura 21 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 25 codificante de Scoe3, proteína de código de acceso de NCBI CAB88833.1 GI:7635996, proteína secretada putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

la figura 22 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 26), Scoe4, proteína de código de acceso de NCBI CAB89450.1 GI:7672261, proteína secretada putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

20 la figura 23 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 27 codificante de Scoe4, proteína de código de acceso de NCBI CAB89450.1 GI:7672261, proteína secretada putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

la figura 24 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 28), Scoe5, proteína de código de acceso de NCBI CAB62724.1 GI:6562793, lipoproteína putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

25 la figura 25 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 29, codificante de Scoe5, proteína de código de acceso de NCBI CAB62724.1 GI:6562793, lipoproteína putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)],

30 la figura 26 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 30), Srim1, proteína de código de acceso de NCBI AAK84028.1 GI:15082088, lipasa GDSL [*Streptomyces rimosus*],

la figura 27 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 31 codificante de Srim1, proteína de código de acceso de NCBI AAK84028.1 GI:15082088, lipasa GDSL [*Streptomyces rimosus*],

35 la figura 28 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 32), una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC nº 7965),

la figura 29 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 33) codificante de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC nº 7965),

40 la figura 30 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 34) de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC nº 14174),

45 la figura 31 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 35) codificante de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC nº 14174),

la figura 32 muestra que los homólogos de los genes de *Aeromonas* pueden identificarse utilizando el servicio de herramienta de búsqueda de alineación local básica del National Center for Biotechnology Information, NIH, MD, USA, y las bases de datos de genomas completadas. Se utilizó el motivo GDSX en la búsqueda de la base de datos y se identificaron varias secuencias/genos potencialmente codificantes de enzimas con actividad lipolítica. Se identificaron genes de los géneros *Streptomyces*, *Xanthomonas* y *Ralstonia*. A título de ejemplo, proporcionado posteriormente, se alineó el gen de *Ralstonia solanacearum* con el gen de *Aeromonas salmonicida* (satA). La alineación por pares mostró una identidad de 23%. El sitio activo serina se encuentra presente en el extremo aminoterminal y pueden identificarse los residuos catalíticos histidina y ácido aspártico.

50 La figura 33 muestra que la secuencia de consenso Pfam00657.11 [familia 00657, versión 11 de la base de datos] (en lo sucesivo denominada consenso de Pfam) y la alineación de diversas secuencias con la secuencia de consenso de Pfam. Las flechas indican los residuos del sitio activo, las cajas subrayadas indican tres de las cajas de homología indicadas por [Upton C. y Buckley J.T., Trends Biochem. Sci. 20:179-179, 1995]. Las letras mayúsculas en el consenso de Pfam indican residuos conservados en muchos miembros de la familia. El símbolo '-' indica una posición en la que el modelo oculto de Markov del consenso de Pfam esperaba encontrar un residuo pero no lo encontró, por lo que se insertó un hueco. El símbolo indica un residuo sin un residuo correspondiente en el consenso de Pfam. Las secuencias son las secuencias de aminoácidos listadas en las figuras 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 30.

65 La figura 34 muestra la secuencia de consenso Pfam00657.11 [familia 00657, versión 11 de la base de datos] (en lo sucesivo denominada consenso de Pfam) y la alineación de diversas secuencias con la secuencia de consenso de

Pfam. Las flechas indican los residuos del sitio activo, las cajas subrayadas indican tres de las cajas de homología indicadas por [Upton C. y Buckley, J.T., Trends Biochem. Sci. 20:179-179, 1995]. Las letras mayúsculas en el consenso de Pfam indican residuos conservados en muchos miembros de la familia. El símbolo '-' indica una posición en la que el modelo oculto de Markov del consenso Pfam esperaba encontrar un residuo pero no lo encontró, por lo que se insertó un hueco. El símbolo indica un residuo sin un residuo correspondiente en el consenso de Pfam. Las secuencias son las secuencias de aminoácidos listadas en las figuras 2, 16, 18, 20, 26, 28 y 30. Se encontró que todas estas proteínas eran activas contra sustratos lípidos.

La figura 35 muestra un vector de expresión pet12-AsalGCAT=pSM que contiene el gen de lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* C-terminal etiquetado con His.

La figura 36 muestra los resultados del ensayo de extractos celulares en un kit de ensayo NEFA, que ilustra la actividad de una lípido aciltransferasa de *A. salmonicida* recombinante hacia la lecitina. Los pocillos de izquierda a derecha indican: un control positivo, un control negativo (es decir, extractos del plásmido vacío) y muestras recogidas tras 0, 1, 2 y 3 horas de cultivo tras la inducción con IPTG,

la figura 37 muestra la optimización del cultivo de BL21 (DE3)pLysS que porta el vector de expresión pet12-AsalGCAT=pSM, mostrando que el cultivo a 30°C resulta en la producción de enzima con actividad elevada hacia la lecitina. Se sometieron a ensayo los extractos celulares para actividad de fosfolipasa utilizando el kit de ensayo NEFA. Los pocillos, de izquierda a derecha: control positivo, control negativo, 20°C, 30°C.

La figura 38 muestra extractos celulares crudos de BL21(DE3)pLysS que expresa la lípido aciltransferasa activa incubada con el sustrato lecitina y la mezcla de reacción se analizó utilizando cromatografía de capa fina, mostrando la presencia de productos de degradación. Carriles: 1. - sin enzima; 2. +A. sal. -10 µl, 37°C; 3. +A. sal - 20 µl, 37°C; 4. +A. sal. -10 µl, 24°C; . +A. sal. -20 µl, 24°C.

La figura 39 muestra la purificación parcial de la aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* que muestra la actividad de fosfolipasa asociada a proteína etiquetada con His purificada. SE=extractos sonicados, His=purificado con el kit para centrifugación Ni-NTA de Qiagen.

La figura 40 muestra el vector de expresión pet12-A.h. Se utilizó GCAT=pSMa que contenía el gen de la glicerolípid aciltransferasa (GCAT) de *Aeromonas hydrophila* C-terminal etiquetado con His para transformar *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS.

La figura 41 muestra la actividad de los extractos crudos (5 y 10 µl) que contenían el enzima GCAT de *Aeromonas hydrophila* recombinante, sometido a ensayo frente a lecitina utilizando el kit de ácidos grasos no esterificados (NEFA) (Roche, Suiza), que muestra la actividad del enzima activo hacia el fosfolípido lecitina.

La figura 42 muestra la optimización del cultivo de BL21(DE3)pLysS que porta el vector de expresión pet12-AsalGCAT=pSM, mostrando que el cultivo a 30°C resultaba en la producción de enzima de alta actividad hacia la lecitina. Se sometieron a ensayo extractos celulares para actividad de fosfolipasa utilizando el kit de ensayo NEFA.

La figura 43 muestra la purificación parcial de las aciltransferasas de *Aeromonas hydrophila* y de *A. salmonicida*, mostrando la actividad de fosfolipasa asociada a proteína etiquetada con His purificada. SE=extractos sonicados, His=purificado con el kit para centrifugación Ni-NTA de Qiagen).

La figura 44 muestra la expresión de los genes de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis* 163, mostrando la producción de enzima secretado con actividad hacia tanto lecitina como DGDG. pUB-AH=constructo que contiene el gen de *A. hydrophila* y pUB-AS, constructo con el gen de *A. salmonicida*. Se incubó el filtrado del cultivo con los sustratos durante 60 minutos.

Las figuras 45 y 46 muestran gráficos que ilustran los ácidos grasos y éster de colesterol como función del tiempo. Los gráficos ilustran los resultados obtenidos para el análisis de GLC en el ensayo para la medición de la actividad de aciltransferasa en un producto alimentario utilizando lecitina y colesterol en tampón como sustrato.

La figura 47 muestra una secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 36) del constructo de fusión para la mutagénesis del gel de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* en el Ejemplo 17. Los aminoácidos subrayados son un péptido de señal de xilanasas.

La figura 48 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 54) codificante de un enzima de *Aeromonas hydrophila* que incluye un péptido de señal de xilanasas.

La figura 49 muestra la estructura de los condensados de proteína-ácido graso de aminoácidos.

La figura 50 muestra un esquema que representa la reacción entre un ácido graso de la fosfatidilcolina al transferirse al grupo hidroxilo libre de aminoácidos que presentan un grupo hidroxilo libre disponible para la esterificación, por

ejemplo tirosina o serina, y la figura 51 muestra un esquema de la reacción entre DGDG y glucosa catalizada por una lípido aciltransferasa.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación, secuenciación y expresión heteróloga de una transferasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*

Cepas utilizadas:

Se obtuvo *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC nº 14174) de la ATCC y se cultivó durante la noche a 30°C en medio de Luria-Bertani (LB). Las células se centrifugaron y se aisló el ADN genómico utilizando los procedimientos para el aislamiento del ADN genómico de Qiagen Ltd. Se obtuvo el conjunto de tampones de ADN genómico (nº de cat. 19060), la proteasa K (nº de cat. 19131) y la ARNasa A (nº de cat. 19101) de Qiagen Ltd. (Boundary court, Gatwick Court, West Sussex, RH10 2AX).

La cepa bacteriana huésped BL21 (DE3)pLysS (Novagen) se utilizó para la producción de enzimas de *Aeromonas* recombinante. Se utilizaron células competentes de BL21 (DE3)pLysS como huésped para la transformación con el vector de expresión pet12-AsalGCAT=pSM. Los transformantes que contenían el plásmido apropiado se cultivaron a 37°C en medio agar LB que contenía 100 µg de ampicilina/ml.

Construcción del vector de expresión pet12-AsalGCAT-pSM:

Para todas las amplificaciones de ADN de los genes de transferasa de *Aeromonas*, se utilizó ADN genómico (0,2 a 1 µl) como molde y ADN polimerasa Pfu (2,5 unidades) con 10 µl de tampón pfu 10x, 1 µl de cada cebador (50 pmoles/µl), 200 µM de dNTP en un volumen de reacción total de 100 µl. Se llevaron a cabo reacciones de PCR en un ciclador térmico programable utilizando las condiciones siguientes: 95°C durante 30 segundos, 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos. Se aplicó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C.

La amplificación por PCR del gen de transferasa de *A. salmonicida* se llevó a cabo en 2 reacciones de PCR separadas. La reacción de PCR 1 se llevó a cabo utilizando parejas de cebadores, as1USNEW(5'AGCATATGAAAA AATGGTTTGT TTGTTTATTG GGG 3' [SEC ID nº 36] y asls950new (5' GTG ATG GTG GGC GAG GAA CTC GTA CTG3' [SEC ID nº 37]). Se llevó a cabo una segunda reacción de PCR para incorporar una etiqueta C-terminal de histidinas utilizando el producto de PCR de la primera reacción y los cebadores as1USNEW(5'AGCATATGAAAA AATGGTTTGT TTGTTTATTG GGG 3' [SEC ID nº 38]) y AHL1001(5'TTGGATCC GAATTCAT CAATG GTG ATG GTG ATG GTG GGC3' [SEC ID nº 39]). El producto de PCR de la segunda reacción se purificó y se digirió con los enzimas de restricción Nde1 y BamHI. También se digirieron 2 µg de vector de ADN pET12a con los enzimas de restricción Nde1 y BamHI y se trataron con fosfatasa. Tanto pet12a como el producto de PCR de la reacción 2 tratados con enzimas de restricción se purificaron y se ligaron utilizando el kit de ligación rápida (Roche, Suiza). Se utilizó la mezcla de ligación para transformar células de *E. coli* TOP10. Se sembraron los transformantes en una placa con medio agar LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina.

Se utilizó el cebador de promotor de T7 (5'TAATACGACTCACTATAG3' [SEC ID nº 40]) y el cebador de terminador de T7 (5'CTAGTTATTGCTCAGCGG3' [SEC ID nº 41]) para verificar las secuencias y la orientación de los genes de transferasa clonados en el vector pET12a. Se llevó a cabo la secuenciación de ADN utilizando el kit de secuenciación en ciclos ABI Prism® BigDye™ Terminators con 500 ng de plásmido de ADN como molde y 3,2 pmoles de cebadores de promotor y terminador de T7.

El constructo mostrado en la figura 35 se utilizó para transformar la cepa huésped bacteriana competente BL21(DE3)pLysS (Novagen) y se recogieron los transformantes resistentes a la ampicilina y se utilizaron para el análisis de la expresión.

Expresión de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* recombinante

La cuantificación de la actividad enzimática hacia la lecitina se determinó en extractos celulares utilizando el kit de ácidos grasos no esterificados (NEFA) (Roche, Suiza).

En la figura 36, se cultivó BL21(DE3)pLysS que portaba el vector de expresión pet12-AsalGCAT=pSM en medio LB + 100 µg/ml de ampicilina y se incubó bajo agitación a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀=0,6 a 1,0. A continuación, se indujeron los cultivos utilizando IPTG (0,4 mM) y se continuó la incubación durante las 3 horas siguientes. Se extrajeron muestras a las 0, 1, 2 y 3 horas tras la inducción con IPTG. Se sometió a cabo la actividad enzimática utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato.

Optimización del cultivo para la producción de enzimas más activas: se cultivó BL21(DE3)pLysS que portaba el vector de expresión pet12-AsalGCAT=pSM en medio LB + 100 µg/ml de ampicilina y se incubó bajo agitación a

diferentes temperaturas de cultivo (37°C, 30°C y 20°C). Las condiciones óptimas para la producción de enzima lípido aciltransferasa activo se dieron con los cultivos mantenidos a 30°C, tal como se muestra en la figura 37.

5 Purificación parcial de la transferasa de *Aeromonas salmonicida* recombinante: se cultivó cepa BL21(DE3)pLysS que portaba el vector de expresión pet12-AsaLGCAT=pSM a 37°C y los extractos celulares crudos se prepararon mediante sonicación. El enzima recombinante se purificó adicionalmente a partir de los extractos celulares crudos sonificados utilizando el kit para centrifugación Ni-NTA de Qiagen. Actividad de fosfolipasa utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato. Se incubaron extractos celulares crudos de BL21(DE3)pLysS que expresaba transferasa activa con el sustrato lecitina y la mezcla de reacción se analizó utilizando cromatografía de capa fina que mostraba la presencia de productos de degradación (ver la figura 38).

15 Purificación parcial de la transferasa de *Aeromonas salmonicida* recombinante. Se cultivó a 37°C la cepa BL21(DE3)pLysS que portaba el vector de expresión pet12-AsaLGCAT=SM y los extractos celulares crudos se prepararon mediante sonicación. El enzima recombinante se purificó adicionalmente a partir del extracto celular crudo sonificado utilizando el kit para centrifugación Ni-NTA de Qiagen. Se sometió a ensayo la actividad de fosfolipasa utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato (ver la figura 39).

Ejemplo 2: Clonación y expresión de la transferasa de *Aeromonas hydrophila* en *E. coli*

20 Se obtuvo *Aeromonas hydrophila* (ATCC n° 7965) de la ATCC y se cultivó durante la noche a 30°C en medio de Luria-Bertani (LB). Las células se centrifugaron y se aisló el ADN genómico utilizando los procedimientos para el aislamiento de ADN genómico de Qiagen Ltd. Se obtuvieron el conjunto de tampones de ADN genómico (n° de cat. 19060), la proteasa K (n° de cat. 19131) y la ARNasa A (n° de cat. 19101) de Qiagen Ltd. (Boundary Court, Gatwick Court, West Sussex, RH10 2AX).

25 La cepa bacteriana huésped BL21(DE3)pLysS (Novagen) se utilizó para la producción de los enzimas de *Aeromonas* recombinante. Se utilizaron células competentes de BL21(DE3)pLysS como huésped para la transformación con el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT=pSMa. Los transformantes que contenían el plásmido apropiado se cultivaron a 37°C en medio agar LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina.

30 Construcción del vector de expresión pet12a-A.h.GCAT-pSMa:

35 Para todas las amplificaciones de ADN del gen de transferasa de *Aeromonas*, se utilizó ADN genómico (0,2 a 1 µl) como molde y ADN polimerasa Pfu (2,5 unidades) con 10 µl de tampón pfu 10x, 1 µl de cada cebador (50 pmoles/µl), 200 µM dNTP en un volumen de reacción total de 100 µl. Se llevaron a cabo reacciones de PCR en un ciclador térmico programable utilizando las condiciones siguientes: 95°C durante 30 segundos, 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos. Se aplicó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C.

40 La amplificación por PCR del gen de transferasa de *A. hydrophila* (ATCC n° 7965) se llevó a cabo en 2 reacciones de PCR separadas.

45 La reacción de PCR 1 se llevó a cabo utilizando las parejas de cebadores AHUS1 (5'GTCATATGAAAAATGGTTTGTGTGTTTATTGGGATTGGTC3', SEC ID n° 42) y ahls950 (5'ATGGTGATGGTGGGCGAGGAACTCGTACTG3', SEC ID n° 43).

Se llevó a cabo una segunda reacción de PCR para incorporar una etiqueta C-terminal de histidinas utilizando el producto de PCR de la primera reacción y las parejas de cebadores siguientes:

50 AHUS1(5'GTCATATGAAAAATGGTTTGTGTGTTTATTGGGATTGGTC3', SEC ID n° 44) y AHLS1001 (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATGGTGGTGGGC3', SEC ID n° 45).

55 El producto de PCR de la segunda reacción se purificó y se digirió con los enzimas de restricción NdeI y BamHI. También se digirieron 2 µg del vector de ADN pET12a con los enzimas de restricción NdeI y BamHI y se trataron con fosfatasa. Tanto pet12a como el producto de PCR de la reacción 2 tratados con los enzimas de restricción se purificaron y se ligaron utilizando el kit de ligación rápida (Roche, Suiza). Se utilizó la mezcla de ligación para transformar células de *E. coli* TOP10. Los transformantes se sembraron en una placa con medio LB-agar que contenía 100 µg/ml de ampicilina.

60 Se utilizaron el cebador de promotor de T7 (5'TAATACGACTCACTATAG3') y el cebador de terminador de T7 (5'CTAGTTATTGCTCAGCGG3') para verificar las secuencias y la orientación de los genes GCAT clonados en el vector pET12a. Se llevó a cabo la secuenciación de ADN utilizando el kit de secuenciación en ciclos ABI Prism® BigDye™ Terminators con 500 ng de plásmido de ADN y 3,2 pmoles de cebadores de promotor y terminador de T7.

65 Se utilizó el constructo mostrado en la figura 40 para transformar la célula huésped bacteriana competente BL21(DE3)pLysS (Novagen) y se recogieron los transformantes resistentes a ampicilina para el análisis de la

expresión.

Expresión de la transferasa de *Aeromonas hydrophila* en BL21(DE3)pLysS

5 Se cultivó la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS que portaba el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT=pSMa en medio LB + 100 µg/ml de ampicilina y se incubó bajo agitación a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀=0,6 a 1,0. A continuación, se indujeron los cultivos con IPTG (0,4 mM) y se continuó la incubación durante las 3 horas siguientes. Se extrajeron muestras a las 0, 1, 2 y 3 horas tras la inducción con IPTG. Se sometió a ensayo la actividad enzimática utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato (figura 41).

10

Optimización del cultivo para la producción de enzimas más activos

15 Se cultivó BL21(DE3)pLysS que portaba el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT=pSMa en medio LB + 100 µg/ml de ampicilina y se incubó bajo agitación a diferentes temperaturas de cultivo (37°C, 30°C y 20°C). Las condiciones óptimas para la producción de enzima GCAT activo se dieron al mantener los cultivos a 30°C, tal como se muestra en la figura 42.

Purificación parcial de transferasa de *A. hydrophila* recombinante (GCAT)

20 Se cultivó a 37°C la cepa BL21(DE3)pLysS que portaba el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT=PSMa y se prepararon extractos celulares crudos mediante sonicación. El enzima recombinante se purificó adicionalmente a partir de los extractos celulares crudos sonicados utilizando el kit para centrifugación Ni-NTA de Qiagen. Ensayo de actividad de fosfolipasa utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato (figura 43).

25 **Ejemplo 3: Expresión de transferasas de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis* 163**

Construcción de plásmido

30 Se utilizaron dos vectores de expresión de *Bacillus subtilis* diferentes (pUB110 y pBE5) para la expresión heteróloga de los genes de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis*. El vector pUB110 contiene el promotor de alfa-amilasa, mientras que el vector pBE presenta el promotor P32 como región reguladora para la expresión de los genes de *Aeromonas* fusionados. En pUB110, el primer aminoácido de los genes GCAT maduros de *Aeromonas* se fusionó en el mismo marco de lectura con el último aminoácido de la secuencia del péptido de señal de xilanasa de *Bacillus subtilis* mediante el sitio de restricción Nhe1, creando 2 aminoácidos adicionales enfrente de las proteínas maduras. El vector pBE5 contiene la fusión de secuencia de señal cgtasa en el sitio NcoI para la secreción de las proteínas recombinantes al filtrado de cultivo.

35

40 Se llevaron a cabo reacciones de PCR para obtener los genes de *Aeromonas* fusionados en el mismo marco de lectura de las secuencias de señal de los vectores pUB110 y pBE5. Se llevaron a cabo PCR utilizando las parejas de cebadores siguientes para el gen de *A. hydrophila*:

reacción de PCR 1: usAHncoI (5'ATGCCATGGCCGACAGCCGTCCCGCC3', SEC ID nº 46) e IsAH (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 47)

45 reacción de PCR 2 : US-AhnheI (5'TTGCTAGCGCCGACAGCCGTCCCGCC3', SEC ID nº 48) e IsAH (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 49)

Se llevaron a cabo PCR utilizando las parejas de cebadores siguientes para el gen de *A. salmonicida*:

50 reacción de PCR 3: US-AsncoI (5'TTGCCATGGCCGACACTCGCCCCGCC3', SEC ID nº 50) e IsAH (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 51)

reacción de PCR 4: US-ASnheI (5'TTGCTAGCGCCGACACTCGCCCCGCC3', SEC ID nº 52) e IsAH (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 53)

55

Todos los productos de PCR se clonaron en PCR blunt II (vector TOPO) y se secuenciaron con cebadores de secuenciación inverso y directo.

60 Los clones de las reacciones de PCR 1 y 3 se cortaron con NcoI y BamHI y se utilizaron como inserciones para la ligación al vector pBE5 cortado con NcoI/BamHI/fosfatasa. Los clones de las reacciones de PCR 2 y 4 se cortaron con NheI y BamHI y se utilizaron como inserciones para la ligación al vector pUB que se cortó con NheI/BamHI/fosfatasa.

Expresión de los genes de transferasa de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis* y caracterización de la actividad enzimática

65

Las aciltransferasas de las dos especies de *Aeromonas* han sido expresadas con éxito en *E. coli* (resultados

anteriormente). Se utilizaron los constructos de fusión génica pUB110 y pBE5 de *Bacillus* para transformar *Bacillus subtilis* y se seleccionaron los transformantes mediante cultivo en placas con canamicina. Los transformantes resistentes a la canamicina aislados y cultivados en 2xYT son capaces de la expresión heteróloga de los genes de *Aeromonas* en *Bacillus*. Los filtrados de cultivo presentan actividad digalactosildiacilglicerol (DGDG) galactolipasa, además de presentar actividades tanto de aciltransferasa como de fosfolipasa. Se midió la actividad hacia el digalactosildiacilglicerol (DGDG) tras 60 minutos de incubación del sobrenadante de cultivo con el sustrato, DGDG procedente de harina de trigo (obtenible de Sigma), así como la actividad hacia la lecitina, tal como se muestra en la figura 44. *Bacillus* produjo el enzima tras el cultivo durante un periodo de entre una noche (20 a 24 horas) y 48 horas en el medio de cultivo en forma de proteína secretada. En algunos casos, se ha demostrado que la expresión de los genes de *Aeromonas* interfieren con la viabilidad y crecimiento celulares en *Bacillus* y *E. coli*; por lo tanto resulta necesario seleccionar cuidadosamente las cepas de expresión y optimizar las condiciones de cultivo para garantizar la expresión. Por ejemplo, se transformaron varias cepas huésped de *Bacillus* (B.s.163, DB104 y OS21) con los vectores de expresión para una comparación del crecimiento. La cepa B.s.163 es transformable con los 2 genes de *Aeromonas* y es capaz de expresar la proteína activa. DB104 es transformable con todos los constructos pero sólo es capaz de expresar la transferasa de *A. salmonicida*.

Ejemplo 4: Fermentación y purificación de las lípidos aciltransferasas de *Aeromonas* producidas en *E. coli*

Fermentaciones de *E. coli*:

Microorganismos

En el presente estudio se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli*, una que contenía una lípidos aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (Ejemplo 2) y dos que contenían las lípidos aciltransferasas de *Aeromonas salmonicida* (Ejemplo 1).

La cepa de *E. coli* que contenía el gen de *A. hydrophila* se denominó DIDK0124, y la cepa de *E. coli* que contenía el gen de *A. salmonicida* se denominó DIDK0125. La fermentación con DIDK0124 se denominó HYDRO0303 y la fermentación con DIDK0125 se denominó SAL0302. La proteína purificada de HYDRO025 se denominó REF nº 138. La proteína purificada de HYDRO0303 se denominó REF nº 135.

Medio de cultivo y condiciones de cultivo

LB-agar

Las placas de LB-agar utilizadas para mantener las cepas contenían: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar, 100 mg/l de ampicilina y 35 mg/l de cloranfenicol. Las placas de agar se incubaron a 30°C.

Matraz de agitación con LB

El medio LB (50 ml por cada matraz de agitación) utilizado para la producción del material de inóculo para los cultivos en biorreactor contenían: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 100 mg/l de ampicilina y 35 mg/l de cloranfenicol. Se inocularon los matraces de agitación con el inóculo procedente de las placas de LB-agar y se incubaron a 30°C y 200 rpm.

Cultivo en biorreactor

Los cultivos en biorreactor se llevaron a cabo en biorreactores de propia construcción de 6 l llenos con 4 l de medio que contenía: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 8 g/l de KH₂PO₄, 0,9 g/l de MgSO₄·7H₂O, 40 g/l de glucosa monohidrato, 0,4 ml de ADD APT[®] Foamstop Sin260 (ADD APT Chemicals Ag, Helmond, Países Bajos), 10 mg/l de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, 0,7 mg/l de CuSO₄·5H₂O, 3 mg/l de ZnSO₄·7H₂O, 3 mg/l de MnSO₄·H₂O, 10 mg/l de EDTA, 0,1 mg/l de NiSO₄·6H₂O, 0,1 mg/l de CoCl₂, 0,1 mg/l de H₃BO₄, 0,1 mg/l de KI, 0,1 mg/l de Na₂MoO₄·2H₂O, 1 g/l de ampicilina y 35 mg/l de cloranfenicol.

Se inocularon los biorreactores con una cantidad de cultivo en LB que garantizase el final del crecimiento tras aproximadamente 20 horas de cultivo (calculadas a partir de la tasa de crecimiento específico máxima de 0,6 h⁻¹, la DO₆₀₀ del matraz de agitación de LB y una DO₆₀₀ final en el biorreactor de aproximadamente 20).

Se inoculó SAL0302 con 10 ml de cultivo en LB, y se inoculó HYDRO0303 con 4 ml de cultivo en LB.

Se operaron los biorreactores a las condiciones siguientes: temperatura de 30°C, agitación de entre 800 y 1.000 rpm (según el experimento), aireación de 5 l/min, pH 6,9, control de pH de NH₃-agua al 8,75% (p/v) y H₂SO₄ 2 M. Se consiguió la inducción mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido hasta una concentración final de 0,6 mM, momento en el que se habían producido 0,4 moles (HYDRO0303) y 0,7 moles de CO₂, respectivamente.

Recolección

Se utilizó el procedimiento siguiente para la recolección y homogeneización de la biomasa:

- 5 1) Se centrifugó el caldo de fermentación de las fermentaciones a 5.000xg y a 4°C durante 10 minutos, y se descargó el sobrenadante. La biomasa se almacenó a -20°C hasta la utilización. Se descongeló la biomasa y se resuspendió en 500 ml de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM e inhibidor de proteasa completo (sin EDTA) (Roche, Alemania).
- 10 2) La biomasa suspendida se homogeneizó a 2 kbar y a 4°C en un aparato de ruptura celular de Constant Systems Ltd. (Warwick, Reino Unido).
- 3) Se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación a 10.000xg y a 4°C durante 30 minutos seguido de la recolección del sobrenadante.
- 15 4) Se clarificó adicionalmente el sobrenadante mediante centrifugación a 13.700xg y a 4°C durante 60 minutos, seguido de la recolección del sobrenadante.
- 20 5) Se filtró el sobrenadante a través de filtros VacuCap de 0,2 µm (Pall Life Sciences, Reino Unido) y el filtrado se recogió para la purificación cromatográfica inmediata.

Purificación cromatográfica de las transferasas

25 Se empaquetó una columna (2,5x10 cm) con 50 ml de gel de sefrosa quelante FF y cargada con sulfato de Ni (según el método descrito por el fabricante, Amersham Biosciences). La columna se equilibró con 200 ml de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM. Se aplicaron 400 ml de crudo a la columna a un caudal de 5 ml/minuto. A continuación, se lavó la columna con NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM hasta al UV₂₈₀ alcanzase la línea base. Seguidamente se eluyó la GCAT con 40 ml de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM.

30

Ejemplo 5: Fermentación y purificación de las lípido aciltransferasas de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis*Fermentaciones

35 BAC0318-19, BAC0323-24

Microorganismo

40 Los microorganismos utilizados en el presente estudio se originan de la transformación de una cepa huésped de *Bacillus subtilis*, n° 163, con un plásmido que contenía el gen codificante de la transferasa de *Aeromonas salmonicida* insertada en el vector pUB110OIS. La expresión del gen se encuentra controlada por un promotor alfa-amilasa, y la secreción de la transferasa se encuentra mediada por la secuencia de señal de xilanasasa de *B. subtilis* (Ejemplo 3). Las cepas se denominaron DIDK0138 (fermentación BAC0318-19) y DIDK0153 (fermentación BAC0323-24).

45

Medio y condiciones de cultivoMedio de precultivo

50 A un matraz de agitación (volumen total de 500 ml, con deflectores) se añadieron 100 ml de un medio que contenía:

NaCl	5 g/l
K ₂ HPO ₄	10 g/l
Harina de soja	20 g/l
Extracto de levadura, BioSpringer 106	20 g/l
Antiespumante SIN260	5 ml/l

Se ajustó el pH a 7,0 antes del autoclavado.

55 Tras el autoclavado, se añadieron 6 ml de nutritosa al 50% (p/p) en cada matraz. Se añadió canamicina a una concentración de 50 mg/l tras el autoclavado.

Inoculación

60 Se inoculó un matraz de agitación precultivo con cultivo congelado directamente procedente de una solución madre de glicerol al 25% (p/v). Se incubó el matraz de agitación a 33°C y 175 rpm durante aproximadamente 16 horas,

después de lo cual se utilizaron 50 ml para inocular el fermentador.

Fermentaciones

- 5 Las fermentaciones se llevaron a cabo en fermentadores de 6 l de construcción propia.

El medio del lote (3 l) contenía:

Licor de maíz fermentado (al 50%, peso seco)	40 g/l
Extracto de levadura BioSpringer 153 (al 50%, peso seco)	10 g/l
NaCl	5 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,25 g/l
Mn(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	0,2 g/l
Antiespumante SIN260	1 ml/l
Canamicina (esterilizada mediante filtración y añadida al fermentador tras el autoclavado)	50 mg/l

- 10 La alimentación contenía:

Glucosa monohidrato	540 g/kg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,8 g/kg
Antiespumante SIN260	4 ml/kg
Extracto de levadura, BioSpringer 163 (al 50%, peso seco) (autoclavado separadamente)	150 g/kg

La alimentación en la fermentación BAC0318 y BAC0323 se inició basándose en el CO₂ acumulado, de acuerdo con las ecuaciones siguientes:

- 15 Alimentación - flujo[g/h]=0, AcCO₂<0,15
 Alimentación - flujo[g/h]=2,85 +t·1,54, AcCO₂≥0,15 y t<12
 Alimentación - flujo[g/h]=21,3, t>12

- 20 t: tiempo (horas) desde el punto en el que el CO₂ acumulado (AcCO₂) alcanzó los 0,15 moles.

La alimentación en las fermentaciones BAC0319 y BAC0324 se inició basándose en el CO₂ acumulado, de acuerdo con las ecuaciones siguientes:

- 25 Alimentación - flujo[g/h]=0, AcCO₂<0,15
 Alimentación - flujo[g/h]=2,0 +t·1,08, AcCO₂≥0,15 y t<12
 Alimentación - flujo[g/h]=5, t>12

- 30 t: tiempo (horas) desde el punto en el que el CO₂ acumulado (AcCO₂) alcanzó los 0,15 moles.

Se controló el pH a 7,0 mediante la adición de NH₃-agua al 12,5% (p/v) o ácido fosfórico 2 M.

La aireación fue de 3 l/min, correspondiente a 1 vvm.

- 35 La temperatura era de 33°C.

El fermentador estaba dotado de dos propulsores Rushton de 8 cm Ø distanciados por 10 cm.

Recolección

- 40 Se retiró la biomasa mediante centrifugación a 16.000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se esterilizó el sobrenadante mediante esterilización y se utilizó el filtrado para la purificación y los ensayos de aplicación.

- 45 **Ejemplo 6: El "ensayo de transferasa en sustrato tamponado" para la medición de la actividad de aciltransferasa de un enzima**

- 50 Se aisló la lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* y se expresó en *Bacillus subtilis*. Este enzima es muy eficiente en la transferencia de ácidos grasos de la lecitina al colesterol durante la formación de los ésteres de colesterol. También se ha demostrado que el enzima presenta cierta actividad hidrolítica, que se observa a partir de la formación de ácidos grasos libres. Las fosfolipasas tradicionales (EC3.1.1.4 y EC3.1.1.32) presentan la capacidad de hidrolizar la lecitina durante la formación de ácidos grasos libres y lisolecitina y no se ha informado de ninguna reacción de transferasa en estos enzimas.

5 En la presente memoria los presentes inventores detallan un ensayo que puede medir las actividades tanto de transferasa como hidrolítica de los enzimas y de esta manera permite identificar las lípido aciltransferasas según la presente invención; el ensayo utiliza un sustrato que contiene lecitina y colesterol. En el presente trabajo, se utilizó un sustrato basado en fosfatidilcolina y colesterol dispersado en un tampón. Se realizó la cuantificación de los productos de reacción mediante extracción de los lípidos del sustrato seguido del análisis GLC de los componentes lípidos.

10 Procedimiento

10 Materiales

L-alfa-fosfatidilcolina al 95% (vegetal) Avanti nº 441601

Colesterol: Sigma nº de cat. C8503

15 Palmitato de colesteroilo: Sigma nº C6072

Estearato de colesteroilo: Sigma nº C3549

Tampón HEPES: Sigma nº de cat. H3375

Cloroformo, grado analítico.

20 Enzimas

GCAT purificado procedente de *A. salmonicida* nº 178-9

25 Análisis de TLC

Se activó la placa de TLC en un desecador (110°C) durante 1/2 hora.

Se vertieron 100 ml de tampón de corrido en una cámara cromatográfica con tapa. Se taparon las paredes de la cámara con papel de filtro (Whatman 2) con el fin de saturar la cámara con el vapor de solvente.

30 Se introdujo la placa de TLC en un marco y se aplicó la muestra en la placa de TLC a 2 cm del fondo. A continuación, se introdujo la placa de TLC en la cámara de TLC con el tampón de corrido. Al alcanzar el tampón de corrido 14 cm del fondo de la placa, se sacó la placa de TLC y se secó bajo una campana de extracción de humos y después se introdujo en el horno desecador a 110°C durante 10 minutos.

35 A continuación, se sumergió la placa de TLC en el reactivo de revelado, y se secó en el horno desecador a 110°C durante 15 minutos.

40 Tampón de corrido:

Nº IV: cloroformo:metanol:H₂O (65:25:4)

Nº I: P-éter:MTBE:ácido acético (60:40:1)

45 Tampón de revelado (tampón vanadato):

32 gramos de Na₂CO₃ en 300 ml de H₂O (1 M)

Se añadieron 18,2 gramos de pentaóxido de vanadio (V₂O₅) y se disolvieron bajo calentamiento suave.

50 Se enfrió la solución hasta la temperatura ambiente.

Se añadieron cuidadosamente 460 ml de H₂SO₄ 2,5 M (460 ml de H₂O + 61 ml de H₂SO₄).

Se añadió agua hasta 1.000 ml.

55 Análisis de GLC

60 Cromatógrafo capilar de gases Autosystem 9000 de Perkin-Elmer dotado de una columna de sílice fusionado WCOT de 12,5 m x 0,25 mm ID x 0,1 µm de grosor de película, fenil-metilsilicona al 5% (CP Sil 8 CB de Chrompack).

Gas portador: helio.

Inyector: inyección en frío con división de flujo PSSI (temp. inicial: 50°C, calentado a 385°C), volumen: 1,0 µl.
Detector FID: 395°C.

Programa del horno:	1	2	3
Temperatura del horno (°C)	90	280	350
Isoterma, tiempo (min.)	1	0	10
Tasa de incremento térmico (°C/min.)	15	4	

5 Preparación de muestras: se disolvieron 30 mg de muestra en 9 ml de heptano:piridina, 2:1, que contenía heptadecano de estándar interno, 0,5 mg/ml. Se transfirieron 300 µl de solución de muestra a un vial con tapa perforable, se añadieron 300 µl de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y se hicieron reaccionar durante 20 minutos a 60°C.

10 Cálculo: factores de respuesta para monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos y ácidos grasos libres determinados a partir del Estándar 2 (mono-di-triglicérido). Los factores de respuesta para colesterol, palmitato de colesterilo y estearato de colesterilo se determinaron a partir de los materiales de referencia puros.

Resultados: ensayo de transferasas basado en fosfatidilcolina y colesterol como sustrato.

15 A continuación, se sometió a ensayo la actividad de transferasa de la transferasa en un sustrato basado en fosfatidilcolina y colesterol según el procedimiento siguiente.

20 Se disolvieron 450 mg de fosfatidilcolina (>95% de PC Avanti, ítem nº 441601) y 50 mg de colesterol en cloroformo y se evaporó a sequedad bajo vacío. Se transfirieron 300 mg de mezcla de colesterol/fosfatidilcolina a un vaso Wheaton y se añadieron 15 ml de tampón HEPES 50 mM, pH 7. Se dispersó el lípido en el tampón bajo agitación. Se calentó el sustrato a 35°C durante la mezcla con un agitador magnético y se añadieron 0,25 ml de solución de enzima. Lo anterior formaba un ambiente de alto contenido de agua (aproximadamente 95%).

25 Se extrajeron muestras de 2 ml tras 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos de reacción. Inmediatamente se añadieron 25 µl de HCl 4 M para acidificar los ácidos grasos libres y detener la reacción enzimática. Se añadieron 3,00 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente la muestra en un aparato Whirley durante 30 segundos. Se centrifugó la muestra y se aislaron 2 ml de la fase de cloroformo y se filtraron a través de filtros de 0,45 µm hacia el interior de un vaso Dram tarado de 10 ml. El cloroformo se evaporó bajo un flujo de nitrógeno a 60°C y se pesaron nuevamente las muestras. El lípido extraído se analizó mediante GLC.

30 Se muestran los resultados del análisis de GLC en la Tabla 1. Se expresan los resultados en % calculado respecto al lípido extraído. La cantidad de ácido graso y de éster de colesterol formado como función del tiempo se ilustra en la figura 45. Puede concluirse a partir de la figura 45 que la reacción enzimática no es lineal como función del tiempo debido a que se observan actividades iniciales fuertes tanto hidrolítica como de transferasa. Tras aproximadamente 10 minutos y hasta aproximadamente 60 minutos, la reacción muestra una respuesta prácticamente lineal de formación de ácidos grasos y éster de colesterol como función del tiempo. Por lo tanto, se decidió focalizar la atención en la reacción enzimática dentro de dicho intervalo de tiempo.

Tabla 1

Minutos	0	5	10	15	25	40	60
Colesterol, %	10,064	8,943	8,577	8,656	8,102	7,856	7,809
Éster de colesterol, %	0,000	1,571	2,030	2,058	2,282	2,659	3,081
FFA total, %	0,260	1,197	1,239	1,466	2,445	2,943	3,940

40 A partir de los datos de cantidades de lípido en la mezcla de reacción y de la cantidad de enzima añadido resultó posible calcular la formación de ácidos grasos y éster de colesterol expresada como µmoles/ml de enzima (Tabla 2 y figura 46).

45 Tabla 2

Minutos	10	15	25	40	60
	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml
FFA total	58,1	68,7	114,6	138,0	184,7
Éster de colesterol	88,8	90,0	99,3	115,6	133,8

50 A partir de los resultados en la Tabla 2 y la pendiente de las curvas en la figura 46 resulta posible calcular las cantidades de ácidos grasos y de éster de colesterol como función del tiempo expresadas en µmoles/min. por ml de enzima.

Se muestra en la Tabla 3 el cálculo de la actividad hidrolítica y de la actividad de transferasa. Se determinó la actividad relativa de transferasa utilizando el protocolo para la determinación del % de actividad de aciltransferasa tal

como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Tabla 3

Actividad hidrolítica (ácidos grasos)	2,52	µmoles/min. por ml de enzima
Actividad de transferasa (éster de colesterol)	0,94	µmoles/min. por ml de enzima
Actividad total	3,45	µmoles/min. por ml de enzima
Actividad relativa de transferasa	27,1	%
Actividad hidrolítica relativa	72,9	%

5

Cribado de otros enzimas para actividad de transferasa

Se utilizó el método indicado anteriormente para el cribado de diferentes enzimas lipolíticas para la actividad de transferasa e hidrolítica. Se sometieron a ensayo los enzimas tal como se muestra en la Tabla 4.

10

Tabla 4

		1	2	3	4	5
Sustrato	ml	15	15	15	15	15
Transferasa nº178-9 de <i>A. salmonicida</i> 32 PLU-7/ml	ml	0,25				
5%, nº 3016, LIPOPAN [®] F (<i>F. oxysporum</i>)	ml		0,25			
5%, <i>Thermomyces lanuginosus</i>	ml			0,25		
5%, <i>Candida rugosa</i> nº 2983	ml				0,25	
5%, <i>Candida cylindracea</i> nº 3076	ml					0,25

15

El sustrato que contenía 300 mg de fosfatidilcolina/colesterol dispersado en tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, se calentó a 35°C bajo agitación. Se añadió solución de enzima y se mantuvo la muestra a 35°C bajo agitación. Se recogieron muestras a intervalos regulares y se extrajeron con cloroformo. Los lípidos aislados se analizaron mediante GLC y se muestran los resultados en la Tabla 5.

20

Tabla 5

Muestra								
1	Transferasa 178-9							
	Minutos	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	2,516	2,983	2,62	2,894	3,448	3,911
	Colesterol	7,547	6,438	6,365	6,15	6,136	5,936	5,662
	Éster de colesterol	0	1,835	2,177	2,44	2,58	2,851	3,331
2	<i>Fusarium oxysporum</i> (LIPOFAN [®] F)	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	1,345	1,796	1,95	2,487	2,424	2,977
	Colesterol	7,547	7,309	7,366	7,33	7,429	7,341	7,326
	Éster de colesterol	0	0,26	0,386	0,35	0,267	0,36	0,394
3	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	0,853	0,875	1	0,896	1,105	1,009
	Colesterol	7,547	7,384	7,639	7,63	7,675	7,603	7,529
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0
4	<i>Candida rugosa</i> (nº 2938)	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	0,982	0,987	1,02	1,135	1,131	1,15
	Colesterol	7,547	7,438	7,656	7,66	7,638	7,575	7,585
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0
5	<i>Candida cylindracea</i> (nº 3076)	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	1,032	1,097	1,07	1,203	1,131	1,43
	Colesterol	7,547	7,502	7,425	7,65	7,619	7,502	7,411
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0

25

A partir del análisis de GLC, se observó que únicamente la lípido aciltransferasa (178-9) produjo una cantidad significativa de éster de colesterol y de ácidos grasos. La fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* también proporcionó un incremento uniforme de ácidos grasos libres aunque únicamente se observó una cantidad inicial reducida de formación de éster de colesterol, aunque no se observó ningún incremento de éster de colesterol como función del tiempo.

30

Basándose en los datos sobre las cantidades de sustrato lípido y los análisis de GLC resultó posible calcular la actividad relativa de transferasa y la actividad hidrolítica relativa basándose en los resultados entre los 10 y los 60 minutos de reacción. Los resultados de la transferasa 178-9 y la lipasa de *Fusarium oxysporum* se muestran en la

Tabla 6. Los demás enzimas sometidos a ensayo no mostraron ninguna actividad.

Tabla 6

	Transferasa 178-9	<i>Fusarium oxysporum</i>
Actividad hidrolítica, micromoles/min. por ml de enzima	1,03	0,96
Actividad de transferasa, micromoles/min. por ml de enzima	0,40	0,01
Actividad total, micromoles/min. por ml de enzima	1,43	0,98
Actividad hidrolítica relativa	71,8	98,7
Actividad relativa de transferasa	28,2	1,3

5 Los resultados mostrados en la Tabla 6 confirman la existencia de una actividad de transferasa significativa de la lípido aciltransferasa (muestra de 178-9). También se observa que la actividad relativa de transferasa concuerda bien con el experimento indicado en la Tabla 3.

10 Sin embargo, se observó una actividad de transferasa muy reducida de la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum*. Este nivel de transferasa es tan reducido que se encuentra dentro del nivel de incertidumbre del análisis. Tal como se esperaba, la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* presentaba una actividad hidrolítica significativa.

15 Conclusión

Se utilizó un sustrato artificial basado en fosfatidilcolina y colesterol purificados como sustrato para medir la actividad de transferasa de *Aeromonas salmonicida*. Entre los 10 y 60 minutos de tiempo de reacción, el ensayo proporcionó una formación prácticamente lineal de ácidos grasos libres y de éster de colesterol como función del tiempo. Basándose en la actividad entre los 10 y 60 minutos de reacción, se calculó la actividad hidrolítica y la actividad de 20 transferasa.

Basándose en los resultados del ensayo de la lípido aciltransferasa (en este caso una GCAT) de *Aeromonas salmonicida* en un sustrato artificial de fosfatidilcolina/colesterol en tampón, se concluye que este enzima presenta una actividad de transferasa muy buena también en un sistema con un contenido muy alto de agua. 25

La fosfatidilcolina/colesterol en el tampón de ensayo puede utilizarse para medir las actividades de transferasa e hidrolítica de un enzima. La fosfatidilcolina/colesterol en tampón únicamente es lineal dentro de un determinado límite temporal.

30 **Ejemplo 7: Inmovilización de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida***

Se inmovilizó una lípido aciltransferasa (en este caso una GCAT) de *A. salmonicida* sobre Celite 535 535 (de Fluka) mediante precipitación con acetona. Se agitaron lentamente 10 ml de solución de enzima en tampón TEA 20 mM, pH 7, con 0,1 gramos de Celite 535 535 (de Fluka) durante 2 horas a temperatura ambiente. 35

Se añadieron 50 ml de acetona fría todavía bajo agitación.

Se aisló el precipitado mediante centrifugación a 5.000 g durante 1 minuto.

40 Se lavó el precipitado 2 veces con 20 ml de acetona fría.

Se secó el Celite a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

También se ha demostrado que el enzima presenta una elevada actividad en ambientes acuosos con un alto contenido de agua (6% a 89%). Por lo tanto, la transferasa, y otras transferasas, para la utilización en la invención, también pueden utilizarse en aplicaciones de enzima inmovilizado con un contenido significativo de agua. Lo anterior permite la sustitución de los solventes utilizados con las lipasas inmovilizadas actualmente en la bioconversión de lípidos utilizando transferasas. 45

50 **Ejemplo 8: Variantes de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (Ahyd2) (SEC ID nº 36 (figura 47))**

Se introdujeron mutaciones utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange® Multi-Site de Stratagene, La Jolla, CA 92037, USA, siguiendo las instrucciones proporcionadas por Stratagene. 55

Las variantes en Tyr256 mostraron una actividad incrementada hacia los fosfolípidos.

Las variantes en Tyr256 y en Tyr260 mostraron una actividad incrementada hacia los galactolípidos.

Las variantes en Tyr265 mostraron una actividad de transferasa incrementada con galactolípidos como el donador de acilos.

5 Los números indican las posiciones en la secuencia siguiente: un enzima de *Aeromonas hydrophila* la secuencia de aminoácidos del cual se muestra como SEC ID nº 36 en la figura 47 (los aminoácidos subrayados muestran un péptido de señal de xilanasas). La secuencia de nucleótidos es la mostrada como SEC ID nº 54 en la figura 48.

Ejemplo 9: "Ensayo en ambiente de bajo contenido de agua"

10 Reacciones de transferasa de enzimas lipolíticos en ambiente de bajo contenido de agua

Procedimiento

Materiales.

15 Colesterol, Sigma nº de cat. C8503
L-alfa-fosfatidilcolina al 95% (vegetal) Avanti nº 441601
Aceite de soja, Aarhus United, Dinamarca.
20 Cloroformo, grado analítico.

Enzimas:

nº 179, GCAT de *A. salmonicida*
25 nº 2427, fosfolipasa A1 de *Fusarium oxysporum*. LIPOPAN® F de Novozymes, Dinamarca.
nº 1991, fosfolipasa A2 de páncreas, LIPOMOD 22L, de Biocatalysts, Reino Unido.
nº 2373, lipasa de *Candida antarctica*, Novozyme nº 525 L, de Novozymes, Dinamarca.

Ensayo de enzima

30 Se disolvió 13,1% de lecitina y 6,6% de colesterol en aceite de soja mediante calentamiento a 60°C bajo agitación.

Se pesó el sustrato en un vaso de Wheaton de 20 ml y se calentó a 46°C.

35 Se añadieron agua y solución de enzima y se inició la medición del tiempo con un cronómetro.

A intervalos regulares, se transfirieron muestras de 50 mg a un vaso Dram de 10 ml y se congelaron.

Los lípidos aislados se analizaron mediante GLC.

40 Análisis de GLC

Para los protocolos de análisis de GLC ver el Ejemplo 6.

Resultados

45 Se preparó el experimento tal como se muestra en la Tabla 8.

El sustrato, basado en aceite de soja que contenía 13,1% de lecitina y 6,6% de colesterol, se calentó a 46°C. Se añadió la solución de enzima y se inició la medición del tiempo con un cronómetro.

50 Tras 30, 60 y 120 minutos de reacción, se recogieron muestras para el análisis de GLC.

Tabla 8

		1	2	3	4	5
Sustrato	Gram	5	5	5	5	5
Transferasa nº 179-C72, 56 PLU-7/ml	MI		0,3			
Nº 2427, 200 PLU-7/ml	MI			0,3		
PLA-2 nº 1991 de páncreas, 6.300 PLU/ml	MI				0,3	
525L, nº 2373 de Novozyme, 200 LIPU/ml	MI					0,3
Agua	MI	0,3				
% de agua		6	6	6	6	6

55 Se muestran los resultados del análisis de GLC en la Tabla 9. Los resultados se expresan en porcentaje basado en la composición total de la muestra. Basándose en los resultados de la GLC resultó posible calcular la cantidad de ácidos grasos y de éster de colesterol producidos en la reacción enzimático respecto a la muestra de control, sin

enzima añadido. Bajo estas condiciones experimentales, se estimó la actividad enzimática total como la actividad hidrolítica medida en forma de formación de ácidos grasos libres y la actividad de transferasa medida como formación de éster de colesterol. A partir de estos resultados y la información sobre el peso molecular de los ácidos grasos y del éster de colesterol, resultó posible calcular la actividad hidrolítica molar relativa y la actividad relativa molar de transferasa, tal como se muestra en la Tabla 10.

5

Tabla 9

Enzima	Tiempo de reacción (minutos)	Ácidos grasos (%)	Colesterol (%)	Éster de colesterol (%)
Control	120	0.533	7.094	0.000
nº 179	30	0.770	5.761	2.229
nº 179	60	0.852	5.369	2.883
nº 179	120	0.876	4.900	3.667
nº 2427	30	3.269	7.094	0.000
nº 2427	60	3.420	7.094	0.000
nº 2427	120	3.710	7.094	0.000
nº 1991	30	2.871	7.094	0.000
nº 1991	60	3.578	7.094	0.000
nº 1991	120	3.928	7.094	0.000
nº 2373	30	1.418	7.094	0.000
nº 2373	60	1.421	7.094	0.000
nº 2373	120	1.915	7.094	0.000

10

Tabla 10

Enzima	Tiempo de reacción (minutos)	Ácidos grasos producidos	Colesterol utilizado	Éster de colesterol producido	Actividad hidrolítica (%)	Actividad de transferasa (%)
nº 179	30	0,238	1,334	2,229	20	80
nº 179	60	0,319	1,725	2,883	21	79
nº 179	120	0,343	2,195	3,667	18	82
nº 2427	30	2,737	0,000	0,000	100	0
nº 2427	60	2,887	0,000	0,000	100	0
nº 2427	120	3,177	0,000	0,000	100	0
nº 1991	30	2,338	0,000	0,000	100	0
nº 1991	60	3,046	0,000	0,000	100	0
nº 1991	120	3,395	0,000	0,000	100	0
nº 2373	30	0,885	0,000	0,000	100	0
nº 2373	60	0,888	0,000	0,000	100	0
nº 2373	120	1,383	0,000	0,000	100	0

Conclusión

15 En estos experimentos se observó que todos los enzimas sometidos a ensayo mostraban actividad hidrolítica debido a que se incrementa la cantidad de ácidos grasos. Sin embargo, el único enzima que mostraba actividad de transferasa era GCAT de *A. salmonicida*. Por lo tanto, se concluyó que en un sistema aceitoso con lecitina y colesterol que contenía 6% de agua, la fosfolipasa A1 de *Fusarium oxysporum*, la fosfolipasa A2 de páncreas y una lipasa de *Candida antarctica* mostraban únicamente actividad hidrolítica.

20 **Ejemplo 10: La producción de éster de carbohidrato con lípido aciltransferasa inmovilizada se describe en la presente memoria a modo de referencia**

25 Los ésteres de carbohidratos de ácidos grasos, tales como los ésteres de sacarosa y los ésteres de glucosa, son producidos tradicionalmente mediante la reacción de un ácido graso o un jabón de ácido graso y el carbohidrato a temperatura elevada (Journal of the American Oil Chemists' Society 55(4):398-401, 1978). Sin embargo, este procedimiento presenta la desventaja de generar reacciones secundarias y productos secundarios coloreados.

30 Los ésteres de carbohidrato de ácidos grasos pueden producirse mediante una reacción de transferasa utilizando lecitina como donador de ácidos grasos y un carbohidrato como la glucosa como molécula aceptora.

La reacción se lleva a cabo en un reactor de flujo con una lípido aciltransferasa inmovilizada sobre un soporte sólido.

Procedimiento.

35 Se disolvieron 100 gramos en 1.000 ml de agua durante la agitación y después se dispersaron 200 gramos de fosfatidilcolina en la fase agua durante la agitación y se calentaron hasta 40°C.

Se ajustó el pH a 6,5.

Se empaquetó el reactor de flujo con 100 gramos de una lípido aciltransferasa de *A. salmonicida* inmovilizada sobre un soporte sólido.

5 Se introdujo el reactor de flujo en una cámara calorífica a 40°C.

Se bombeó la mezcla de reacción en el interior de la columna con un caudal de 2 ml/min.

10 Se recogió el producto de reacción.

Se eliminó el agua en el producto de reacción mediante evaporación al vacío de capa fina y se aislaron los lípidos.

15 Se separó el éster de glucosa de los demás lípidos mediante fraccionamiento con solventes.

Los ésteres de carbohidrato pueden utilizarse para muchas aplicaciones, tales como emulsionantes eficientes en la industria alimentaria y no alimentaria.

20 **Ejemplo 11: La producción de éster de proteína con una lípido aciltransferasa se describe en la presente memoria a modo de referencia**

25 Pueden producirse condensados de ácidos grasos con aminoácidos, péptidos o proteínas mediante una reacción de transferasa. En esta reacción, se utiliza la fosfatidilcolina como donador para la transferencia del ácido graso al grupo hidroxilo libre de aminoácidos (tales como tirosina, serina o treonina) que presentan un grupo hidroxilo libre disponible para la esterificación.

Procedimiento 1.

30 Se disolvieron 50 gramos de 1-tirosina (o serina o treonina) en 1.000 ml de agua bajo agitación y después se dispersaron 200 gramos de fosfatidilcolina en la fase acuosa bajo agitación y calentamiento a 40°C.

Se ajustó el pH a 7 y se mantuvo este pH con NaOH o HCl.

35 Se añadieron 50 ml del enzima lípido aciltransferasa de *A. salmonicida* y se continuó la reacción a 40°C bajo agitación.

Se recogieron muestras a intervalos regulares y se analizaron mediante TLC y HPLC.

40 Tras 20 horas de reacción, ésta había alcanzado el equilibrio y se detuvo.

Se aisló un condensado de ácido graso tirosina, lecitina y lisolecitina del medio de reacción mediante centrifugación siguiendo métodos estándares (ver "Centrifuges, Filtering" en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, por ejemplo, 2002, de Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

45 El condensado de ácido graso tirosina se purificó adicionalmente mediante cromatografía de columna de interacción hidrofóbica y la fracción que contenía el condensado de ácido graso tirosina se aisló y se eliminó el solvente mediante evaporación (ver Basic Principles of Chromatography en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, de Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2002).

50 Procedimiento 2.

A continuación se sometió a ensayo la actividad de transferasa de una lípido aciltransferasa en un sustrato basado en fosfatidilcolina y 1-tirosina siguiendo el procedimiento siguiente.

55 Se pesaron 450 mg de fosfatidilcolina (>95%, PC Avanti ítem nº 441601) y 50 mg de 1-tirosina en un vaso Wheaton y se añadieron 15 ml de tampón HEPES 50 mM, pH 7. Se dispersó el lípido en el tampón bajo agitación.

60 El sustrato se calentó a 35°C bajo agitación con un agitador magnético y se añadieron 0,25 ml de transferasa 10 PLU/ml.

Se recogieron muestras de 2 ml tras 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos de reacción.

65 Inmediatamente se añadieron 25 µl de HCl 4 M para acidificar el ácido graso libre y detener la reacción enzimática. Se añadieron 3,00 ml de cloroformo y se agitó la muestra vigorosamente en un Whirley durante 30 segundos. Se centrifugó la muestra y se aislaron 2 ml de la fase de cloroformo y se filtraron a través de filtros de 0,45 µm en un vaso Dram tarado de 10 ml.

Se evaporó el cloroformo bajo un flujo de nitrógeno a 60°C y se pesó la muestra nuevamente. El lípido extraído se analizó mediante TLC.

5 **Ejemplo 12: Producción de éster de hidroxiácido (en particular éster de ácido láctico) con una lípido aciltransferasa según la presente invención**

10 Se produjeron tradicionalmente hidroxiésteres de ácido grasos mediante la reacción entre un ácido graso y un hidroxiácido a temperatura elevada utilizando sales inorgánicas o iones metálicos como catalizadores (ver, por ejemplo, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, quinta edición, volumen 3, Edible Oil and Fat Products: Products and Application Technology, páginas 502 a 511). Sin embargo, este procedimiento presenta la desventaja de generar reacciones secundarias y productos secundarios coloreados.

15 En la presente invención, se produjeron ésteres de hidroxiácido de ácidos grasos mediante una reacción de transferasa utilizando lecitina como donador de ácidos grasos y un hidroxiácido (en particular ácido láctico) como molécula aceptora.

Procedimiento

20 Se disolvieron 50 gramos de ácido láctico en 1.000 ml de agua bajo agitación, y después se dispersaron 200 gramos de fosfatidilcolina en la fase acuosa bajo agitación y se calentaron a 40°C.

Se ajustó el pH a 6,5 y se mantuvo a este pH con NaOH o HCl.

25 Se añadieron 50 ml de enzima lípido aciltransferasa de *A. salmonicida* y se continuó la reacción a 40°C bajo agitación.

Se recogieron muestras a intervalos regulares y se analizaron mediante TLC y GLC.

30 Tras 20 horas de reacción, ésta había alcanzado un equilibrio y se detuvo.

Se aislaron éster de ácido láctico, lecitina y lisolecitina del medio de reacción mediante centrifugación siguiendo métodos estándares (ver "Centrifuges, Filtering" en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, por ejemplo, 2002, de Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

35 Se purificó adicionalmente éster de ácido láctico mediante destilación molecular y se obtuvo un éster de ácido láctico de ácido graso de alta pureza.

40 **Ejemplo 13: Producción de éster de ácido cítrico con una lípido aciltransferasa según la presente invención**

Ensayo de transferasa basado en fosfatidilcolina y ácido cítrico como sustrato

A continuación, se sometió a ensayo la actividad de transferasa de la lípido aciltransferasa de *A. salmonicida* en un sustrato basado en fosfatidilcolina y ácido cítrico siguiendo el procedimiento siguiente.

45 Se pesaron 450 mg de fosfatidilcolina (>95%, PC Avanti ítem nº 441601) y 50 mg de ácido cítrico en un vaso Wheaton y se añadieron 15 ml de tampón HEPES, 50 mM pH 7. Se dispersó el lípido en el tampón bajo agitación.

50 Se calentó el sustrato a 35°C bajo agitación con un agitador magnético y se añadieron 0,25 ml de lípido aciltransferasa de *A. salmonicida* 10 PLU/ml.

Se recogieron muestras de 2 ml tras 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos de reacción.

55 Inmediatamente, se añadieron 25 µl de HCl 4 M para acidificar el ácido graso libre y detener la reacción enzimática. Se añadieron 3,00 ml de cloroformo y la muestra se agitó vigorosamente en un Whirley durante 30 segundos. Se centrifugó la muestra y se aislaron 2 ml de la fase de cloroformo y se filtraron a través de filtros de 0,45 µm en un vaso Dram tarado de 10 ml.

60 Se evaporó el cloroformo bajo un flujo de nitrógeno a 60°C y se pesó la muestra nuevamente. El lípido extraído se analizó mediante TLC.

Aunque la presente invención ha sido descrita en relación a formas de realización preferidas específicas, debe entenderse que la invención según las reivindicaciones no se encuentra indebidamente limitada a dichas formas de realización específicas. En efecto, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos de poner en práctica la invención que resultan evidentes para el experto en bioquímica y biotecnología o en campos afines, estén comprendidas dentro del alcance según las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un éster de hidroxiácido, comprendiendo el método la mezcla de un donador de acilos, un aceptor de acilos y agua, con el fin de producir un ambiente de alto contenido de agua que comprenda de entre el 5% y el 98% de agua, en el que dicho donador de acilos es un sustrato lípido seleccionado de entre uno o más del grupo constituido por un fosfolípido, un lisofosfolípido, un triacilglicérido, un diglicérido, un glucolípido o un lisoglucolípido, y dicho aceptor de acilos es un hidroxiácido, y poner en contacto la mezcla con una lípido aciltransferasa, de manera que dicho lípido aciltransferasa cataliza una cualquiera o las dos reacciones siguientes: alcoholisis o transesterificación, en el que la lípido aciltransferasa se caracteriza por un enzima que presenta actividad de aciltransferasa y que comprende la secuencia de aminoácidos motivo GDSX, en el que X es uno o más de los residuos aminoácidos siguientes: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la lípido aciltransferasa se encuentra inmovilizada.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el método comprende purificar el éster de hidroxiácido.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el enzima lípido aciltransferasa comprende H-309 o comprende un residuo histidina en una posición correspondiente a His-309 en la secuencia de aminoácidos del enzima lipolítico de *Aeromonas hydrophila* mostrada como SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lípido aciltransferasa es obtenible a partir de un organismo de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes:
- (i) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 2, (ii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 3, (iii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 4, (iv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 5, (v) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 6, (vi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 12, (vii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 20, (viii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 22, (ix) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 24, (x) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 26, (xi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 28, (xii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 30, (xiii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 32, (xiv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 34, o una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 75% o superior respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 12, SEC ID nº 20, SEC ID nº 22, SEC ID nº 24, SEC ID nº 26, SEC ID nº 28, SEC ID nº 30, SEC ID nº 32 ó SEC ID nº 34.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el enzima lípido aciltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos producida mediante la expresión de una o más de las secuencias de nucleótidos siguientes:
- (a) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 7 (ver la figura 9),
 (b) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 8 (ver la figura 10),
 (c) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 9 (ver la figura 11),
 (d) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 10 (ver la figura 12),
 (e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 11 (ver la figura 13),
 (f) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 13 (ver la figura 15),
 (g) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 21 (ver la figura 17),
 (h) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 23 (ver la figura 19),
 (i) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 25 (ver la figura 21),
 (j) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 27 (ver la figura 23),
 (k) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 29 (ver la figura 25),
 (l) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 31 (ver la figura 27),
 (m) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 33 (ver la figura 29),
 (n) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 35 (ver la figura 31), o
 (o) una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de 75% o superior respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 13, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25, SEC ID nº 27, SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33 ó SEC ID nº 35.
8. Utilización de una lípido aciltransferasa para producir un éster de hidroxiácido mediante catálisis de una o las dos reacciones alcoholisis o transesterificación en una mezcla de un donador de acilos, un aceptor de acilos y agua, comprendiendo la mezcla entre el 5% y el 98% de agua, en la que dicho donador de acilos es un sustrato lípido

seleccionado de entre uno o más del grupo que consiste en un fosfolípido, un lisofosfolípido, un triacilglicérido, un diglicérido, un glucolípido o un lisoglucolípido y dicho aceptor de acilos es un hidroxilácido, en el que la lípido aciltransferasa se caracteriza por un enzima que presenta actividad de aciltransferasa y que comprende la secuencia de aminoácidos motivo GDSX, en el que X es uno o más de los residuos aminoácidos siguientes: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

9. Utilización según la reivindicación 8, en la que la lípido aciltransferasa se encuentra inmovilizada.

10. Utilización según la reivindicación 8, en la que el éster de hidroxilácido se ha purificado.

11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el enzima lípido aciltransferasa comprende H-309 o comprende un residuo histidina en una posición correspondiente a His-309 en la secuencia de aminoácidos del enzima lipolítico de *Aeromonas hydrophila* mostrada como SEC ID nº 2 ó SEC ID nº 32.

12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que la lípido aciltransferasa es obtenible a partir de un organismo de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*.

13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en la que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: (i) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 2, (ii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 3, (iii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 4, (iv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 5, (v) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 6, (vi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 12, (vii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 20, (viii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 22, (ix) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 24, (x) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 26, (xi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 28, (xii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 30, (xiii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 32, (xiv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID nº 34, o una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 75% o superior respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 12, SEC ID nº 20, SEC ID nº 22, SEC ID nº 24, SEC ID nº 26, SEC ID nº 28, SEC ID nº 30, SEC ID nº 32 ó SEC ID nº 34.

14. Utilización según la reivindicación 8, en la que el enzima lípido aciltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos producida mediante la expresión de una o más de las secuencias de nucleótidos siguientes:

- (a) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 7 (ver la figura 9),
- (b) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 8 (ver la figura 10),
- (c) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 9 (ver la figura 11),
- (d) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 10 (ver la figura 12),
- (e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 11 (ver la figura 13),
- (f) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 13 (ver la figura 15),
- (g) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 21 (ver la figura 17),
- (h) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 23 (ver la figura 19),
- (i) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 25 (ver la figura 21),
- (j) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 27 (ver la figura 23),
- (k) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 29 (ver la figura 25),
- (l) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 31 (ver la figura 27),
- (m) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 33 (ver la figura 29),
- (n) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID nº 35 (ver la figura 31), o
- (o) una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de 75% o superior respecto a cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 13, SEC ID nº 21, SEC ID nº 23, SEC ID nº 25, SEC ID nº 27, SEC ID nº 29, SEC ID nº 31, SEC ID nº 33 ó SEC ID nº 35.

Figura 1

SEC ID n° 1

```

1 ivafGDSlTd geayygsdsd ggwgagladr Ltallrlrar prgvdvfnrg isGrtsdGr1
61 ivDalvallF laqslglpnL pPYLsgdflr GANFAsagAt Ilptsgpfli QvqFkdfksq
121 vlelrqalgl lqellrllpv ldakspdlvt imiGtNDlit saffgpkste sdrnsvpef
181 kdnlrqlikr Lrsnngarii vlitlvilnl gplGC1Plkl alalassknv dasgclerln
241 eavadfneal relaiskled qlrkdglpdv kgadvpyvDl ysifqldgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNynrvCG naglcnvtak aCnpssylls flfwDgfhps ekGykavAea
361 1

```

Figura 2

SEC ID n° 2

```

1 mkkwfvcllg lvaltvqaad srpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylp sspyyegrif
61 sngpvwleql tnefpgltia neaeggptav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakeill fnlpldgqnp
181 sarsqkvvea ashvsayhnq lllnlarqla ptgmvklfei dkqfaemlrd pqnfglsdqr
241 nacyggsyvw kpfasrsast dsqlsafnpq erlaiagnpl laqavaspma arsastlnce
301 gkmfwdqvhv ttvhaalse paatfiesqy eflah

```

Figura 3

SEC ID n° 3

```

1 mkkwfvcllg lialtvqaad trpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylp sspyyegrif
61 sngpvwleql tkqfpgltia neaeggatav aynkiswnpk yqvynnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakqill fnlpldgqnp
181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlarqla ptgmvklfei dkqfaemlrd pqnfglsdve
241 npcydggysvw kpfatrsvst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspma rrsasplnce
301 gkmfwdqvhv ttvhaalse raatfietqy eflahg

```

Figura 4

SEC ID n° 4

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadt garltdvtcg aaqtadftra qypgvapqld algtgdlvt
121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgywitpat adpscflklp laagdvpylr aiqahldav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtr wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlglid

```


Figura 5

SEC ID n° 5

```
1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclirsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadftra qypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggnndst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgypwitpat adpscflklp laagdvpylr aiqahlndav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtr wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlgld
```

Figura 6

SEC ID n° 6

```
1 mdyekfllfg dsitefafnt rpiedgkdqy algaalvney trkmdilqrg fkgysrwal
61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagg qsvplpefid nirqmvslmk syhirpiiig
121 pglvdrekwe kekseeialg yfrtnenfai ysdalaklan eekvpfvaln kafqqeggda
181 wqqlldgllh fsgkgykifh dellkvietf ypqyhpknmq yklkdwrdbl ddgsnims
```

Figura 7

Alineación de la secuencia de consenso pfam00657.6 con P10480

```

*->ivafGDSLtdg.....eayygdsgggwgagladrL
iv+fGDSL+d+++ ++ ++ ++++++ +++s+g w ++l + +
P10480 28 IVMFGDSLSDTgkmyskrmrgylpssppYYEGRFSNGPWWLEQLTNEF 74

tall..rlrarprgvdvfnrgisGrtsdGrlivDalvallFlaqlglpn
+ l + ++++++ +n+ +
P10480 75 PGLTIANEAEGGPTAVAYNKISWNPK----- 100

LpPYLsgdflrGANFAsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvllelrqalg
++ ++
P10480 101 -----YQVINN 106

llqellrllpvlidakspdlvtimiGtNDlitsaffgpkstesdrnvspe
l++e+ ++l +++ k+ dl++++G+ND+ ++ ++ ++++++
P10480 107 LDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY-----LAYGWNTQDAKR 148

fkdnlrqlikrLrsnngariivlitlviInlglpGClPlklalalasskn
++d ++++++r+ nga+ +++++nl+ lG+ P+
P10480 149 VRDAISDAANRMV-LNGAK-----EILLFNLPDLGQNPS----- 181

vdasgclerlneavadfnealrelaiskledqlrkdglpdkvadpvyvd
++++ +e + ++a++n++l +la +ql+++g+++++d +++++
P10480 182 ARSQKVVEAASHVSAHYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDKQFAE 226

lysifqldldgignpsayv.y...GFe.ttkaCCGyGgr.yNyn.rv.CG
+ +q+++ + + a+++++ +++ ++++++ +N++++r+ ++
P10480 227 MLRDPQNFGLSDQRNACYgGsyvwKPFaSRASASTDSQLSaFNPQeRLaIA 276

nag.l.c.nvtakaC.npssyll.sflfwDgfHpsekGykavAeal<-*
+++ l + +++++a++ +s+ +++++fwD++Hp+ ++a+ e
P10480 277 GNPLLaQaVASPMARrSASTLNCeGKMFWDQVHPTTVVHAALSEPA 322

```

Alineación de la secuencia de consenso pfam00657.6 con AAG09804

```

*->ivafGDSLtdg.....eayygdsgggwgagladrL
iv+fGDSL+d+++ ++ ++ ++++++ +++s+g w ++l + +
AAG09804 28 IVMFGDSLSDTgkmyskrmrgylpssppYYEGRFSNGPWWLEQLTKQF 74

tallrlrarprgvdvfnrgisGrtsdGrlivDalvallFlaqlglpnLp
+g+++ n + +G+t
AAG09804 75 -----PGLTIANEAEGGAT----- 88

PYLsgdflrGANFAsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvllelrqa....
++++ + +++++ +
AAG09804 89 -----AVAYNKISWNpkyq 102

..lgllqellrllpvlidakspdlvtimiGtNDlitsaffgpkstesdrnv
++l++e+ ++l +++ k+ dl++++G+ND+ ++ ++ ++
AAG09804 103 vYNNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY-----LAYGWNTQEQ 144

svpefkdnlrqlikrLrsnngariivlitlviInlglpGClPlklalala
+++++d ++++++r+ nga+ +++++nl+ lG+ P+
AAG09804 145 DAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLPDLGQNPS----- 181

ssknvdasgclerlneavadfnealrelaiskledqlrkdglpdkvadp
++++ +e + ++a++n++l +la +ql+++g+++++d
AAG09804 182 ----ARSEQVVEAVSHVSAHYHNKLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDK 222

pyvDlysifqldldgignpsayv.y...GFe.ttkaCCGyGgr.yNyn.r
+++++ +q+++ + ++ ++++++ +++ t++ +++ +++ + +++++
AAG09804 223 QFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYdGgyvwKPFaTRSVSTDRQLSaFSPQeR 272

v.CGnag.l.c.nvtakaC.npssyll.sflfwDgfHpsekGykavAeal
+ +++++ l + +++++a++ +s +++++fwD++Hp+ ++a+ e+
AAG09804 273 LaIAGNPLLaQaVASPMARrSASPLNceGKMFWDQVHPTTVVHAALSERA 322

```

<-*

AAG09804 - -

Alineación de la secuencia de consenso pfam00657.6 con NP_631558
 *->ivafGDSlTdgeayygdsgggwgagladrLtallrlrarprgvdvf
 +va+GDS ++g +g + +++L + + + ++ +
 NP_631558 42 YVALGDSYSAG-----SGVLPVDPANL----LCLRSTANYPHV 75

 nrgisGrtsdGrlivD.a.l.vallFlaqlglpnLpPYLsgdfIrgANF
 + ++G++ D + + +
 NP_631558 76 IADTTGAR-----LTDvTcGaaQ----- 93

 AsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlelrqalglIqellrllpvldak
 +++ ++ + ++ ++
 NP_631558 94 -----TADFTRAQYPGVAPQLDALGT 114

 spdlvtimiGtNDl.....itsaffgpkstesdrnvsvp
 + dlvt+ iG+ND ++ + + ++ + ++ + +k ++ + ++
 NP_631558 115 GTDLVTLTIGGNDNstfinaitacgtagvLSGGKGSCKDRHGTSFDDEI 164

 efkdn..lrqlikrLrs.nngariivlitlvilnlG.....plG
 e +++ l++++ +r+++ +ar+ +l ++i+++ +++ + + G
 NP_631558 165 EANTYpaLKEALGVRArAPHARVAALGYPWITPATadpscflklplAAG 214

 ClPlklalalassknvdasgclerlneavadfnealrelaiskledqlrk
 P+ l+ ++a n a+r a
 NP_631558 215 DVPY-----LRAIQAHLNDAVRRAA----- 234

 dglpdkvgadvpyvDlysifqldgIQnpsayvyGFettkaCCGyGgryn
 ++ + +yvD+ ++
 NP_631558 235 -----EETGATYVDFSGVSDG----- 250

 ynrvcGnaglcnvtakaC.npssyll.sflfwDgf...HpsekGykavAe
 ++aC+ p +++ + lf + + + Hp++ G +++Ae
 NP_631558 251 -----HDACeAPGTRWIEPLLFHGSLvpvHPNALGERRMAE 286

 al<-*
 +
 NP_631558 287 HT 288

Alineación de la secuencia de consenso pfam00657.6 con CAC42140
 *->ivafGDSlTdgeayygdsgggwgagladrLtallrlrarprgvdvf
 +va+GDS ++g +g + +++L + + + ++ +
 CAC42140 42 YVALGDSYSAG-----SGVLPVDPANL----LCLRSTANYPHV 75

 nrgisGrtsdGrlivD.a.l.vallFlaqlglpnLpPYLsgdfIrgANF
 + ++G++ D + + +
 CAC42140 76 IADTTGAR-----LTDvTcGaaQ----- 93

 AsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlelrqalglIqellrllpvldak
 +++ ++ + ++ ++
 CAC42140 94 -----TADFTRAQYPGVAPQLDALGT 114

 spdlvtimiGtNDl.....itsaffgpkstesdrnvsvp
 + dlvt+ iG+ND ++ + + ++ + ++ + +k ++ + ++
 CAC42140 115 GTDLVTLTIGGNDNstfinaitacgtagvLSGGKGSCKDRHGTSFDDEI 164

 efkdn..lrqlikrLrs.nngariivlitlvilnlG.....plG
 e +++ l++++ +r+++ +ar+ +l ++i+++ +++ + + G
 CAC42140 165 EANTYpaLKEALGVRArAPHARVAALGYPWITPATadpscflklplAAG 214

 ClPlklalalassknvdasgclerlneavadfnealrelaiskledqlrk
 P+ l+ ++a n a+r a
 CAC42140 215 DVPY-----LRAIQAHLNDAVRRAA----- 234

 dglpdkvgadvpyvDlysifqldgIQnpsayvyGFettkaCCGyGgryn
 ++ + +yvD+ ++
 CAC42140 235 -----EETGATYVDFSGVSDG----- 250

 ynrvcGnaglcnvtakaC.npssyll.sflfwDgf...HpsekGykavAe
 ++aC+ p +++ + lf + + + Hp++ G +++Ae
 CAC42140 251 -----HDACeAPGTRWIEPLLFHGSLvpvHPNALGERRMAE 286

```

                                al<-*
                                +
CAC42140    287 HT      288

Alineación de la secuencia de consenso pfam00657.6 con P41734
*->iva fGDSlTdg...eayygdsgggwgagladrLtallrlrarprg
++fGDS+T+   +++ + + d+   ga+l + +           +r+
P41734      6   FLLEFGDSITEFafntrPIEDGKQYALGAALVNEY-----TRK 43

vdfvfnrgisGrtsdGrlivDalvallFlaqslglpnlpPYLsgdflrGAN
+d+ rg++G+t
P41734     44 MDILQRFKGYT----- 55

FAsagAtIlptsqpfliQvqFkdfksqvlrlrqalglqellrllpvlda
+r+al++l+e+l+ +
P41734     56 -----SRWALKILPEILKH-----E 70

kspdlvtimiGtNDlitsaffgpkstesdrnsvvpefkdnrlqlikrLrs
+ + ti++G+ND+           ++ +++ v++pef+dn+rq+++++s
P41734     71 SNIVMATIFLGANDA-----CSAGPQSVPLPEFIDNIRQMVSLMKS 111

nngariivlitlviInlgplGCiPlklalalassknvdasgclerlneav
+++ii++++lv ++           ++ k ++ + + r+ne +
P41734    112 YHIRPIIIGPGLVDREKW-----EKEKSEEIALGYFRTNENF 148

adfnealrelaiskledqlrkdglpdkadvpyvDlysifqdlldgiqnp
a + al +la           ++ +vp+v l+++fq+ +g++++
P41734    149 AIYSDALAKLA-----NEEKVPFVALNKAFQOEGGDAWQ 182

sayvyGFettkaCCGyGgryNynrvCGnaglcnvtakaCnpssyllsflf
+                               l+
P41734    183 Q-----LL 185

wDgfHpsekGykavAeal<-*
Dg+H+s kGyk+++++l
P41734    186 TDGLHFSGKGYKIFHDEL      203

```

Figura 8

```

A. sal  1  MKKWFVCLLGLIALTVQAADTRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGRF 60
              +           +
A. hyd  1  MKKWFVCLLGLVALTVQAADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGRF 60

A. sal 61  SNGPVWLEQLTKQFPGLTIANEAEGGATAVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTQFLQKDSF 120
              ++           +
A. hyd 61  SNGPVWLEQLTNEFPGLTIANEAEGGPTAVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTQFLQKDSF 120

A. sal 121  KPDDLVLWVGANDYLAYGWNTEQDAKRVRDAISDAANRMVLNGAKQILLFNLPDLGQNP 180
              +
A. hyd 121  KPDDLVLWVGANDYLAYGWNTEQDAKRVRDAISDAANRMVLNGAKEILLFNLPDLGQNP 180

A. sal 181  SARSQKVVEAVSHVSAYHNKLLLNLARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVE 240
              +           +
A. hyd 181  SARSQKVVEAASHVSAYHNQLLLNLARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDQR 240 ++

A. sal 241  NPCYDGGYVWKPFA TRSVSTDRQLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASPLNCE 300
              + ++ +           + + +           +           +
A. hyd 241  NACYGGSYVWKPFA SRSASTDSQLSAFNPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARSASTLNCE 300

A. sal 301  GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAA TFIETQYEF LAH 335
              +           +
A. hyd 301  GKMFWDQVHPTTVVHAALSEPAATFIESQYEF LAH 335
    
```

Figura 9

```

1  ATGAAAAAAT  GGTTTGTGTG  TTTATTGGGA  TTGGTCGCGC  TGACAGTTCA  GGCAGCCGAC
61  AGCCGTCCCG  CCTTCTCCCG  GATCGTGATG  TTTGGCGACA  GCCTCTCCGA  TACCGGCAAG
121  ATGTACAGCA  AGATGCGCGG  TTACCTCCCC  TCCAGCCCCC  CCTACTATGA  GGGCCGCTTC
181  TCCAACGGGC  CCGTCTGGCT  GGAGCAGCTG  ACCAACGAGT  FCCCGGGCCT  GACCATAGCC
241  AACGAGGCGG  AAGGCGGACC  GACCGCCGTG  GCTTACAACA  AGATCTCCTG  GAATCCCAAG
301  TATCAGGTCA  TCAACAACCT  GGACTACGAG  GTCACCCAGT  TCCTGCAAAA  AGACAGCTTC
361  AAGCCGGACG  ATCTGGTGAT  CCTCTGGGTC  GGCGCCAACG  ACTATCTGGC  CTATGGCTGG
421  AACACAGAGC  AGGATGCCAA  GCGGGTGCGC  GACGCCATCA  GCGATGCGGC  CAACCGCATG
481  GTGCTGAACG  GCGCCAAGGA  GATACTGCTG  TTCAACCTGC  CGGATCTGGG  CCAGAACCCC
541  TCGGCCCCGA  GCCAGAAGGT  GGTGAGGGCG  GCCAGCCATG  TCTCCGCCTA  CCACAACCAG
601  CTGCTGCTGA  ACCTGGCAGC  CCAGCTGGCT  CCCACCGGCA  TGGTGAAGCT  GTTCGAGATC
661  GACAAGCAGT  TTGCCGAGAT  GCTGCGTGAT  CCGCAGAACT  TCGGCCTGAG  CGACCAGAGG
721  AACGCCTGCT  ACGGTGGCAG  CTATGTATGG  AAGCCGTTTG  CCTCCCGCAG  CGCCAGCACC
781  GACAGCCAGC  TCTCCGCCTT  CAACCCGCAG  GAGCGCCTCG  CCATCGCCGG  CAACCCGCTG
841  CTGGCCCAGG  CCGTCGCCAG  CCCCATGGCT  GCCCGCAGCG  CCAGCACCCCT  CAACTGTGAG
901  GGCAAGATGT  TCTGGGATCA  GGTCCACCCC  ACCACTGTCG  TGCACGCCGC  CCTGAGCGAG
961  CCCGCCGCCA  CCTTCATCGA  GAGCCAGTAC  GAGTTCCTCG  CCCAC

```

Figura 10

```

1  ATGAAAAAAT GGTGGTTGTTG TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC
61  ACTCGCCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAAA
121 ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC
181 TCCAACGGAC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC
241 AACGAAGCGG AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
301 TATCAGGTCT ACAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTTGCAGAA AGACAGCTTC
361 AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG ACTATCTGGC ATATGGCTGG
421 AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTCGC GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG
481 GTACTGAACG GTGCCAAGCA GATACTGCTG TTCAACCTGC CCGATCTGGG CCAGAACCCG
541 TCAGCCCGCA GTCAGAAGGT GGTCGAGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCCTA TCACAACAAG
601 CTGCTGCTGA ACCTGGCACG CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT GTTCGAGATC
661 GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGGCCTGAG CGACGTCGAG
721 AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG AAGCCGTTTG CCACCCGCAG CGTCAGCACC
781 GACCGCCAGC TCTCCGCCTT CAGTCCGCAG GAACGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841 CTGGCACAGG CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGCAGCG CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTCTG TGCACGCAGC CCTGAGCGAG
961 CGCGCCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCACGGATG A

```

Figura 11

```

1  ATGCCGAAGC CTGCCCTTCG CCGTGTCATG ACCGCGACAG TCGCCGCCGT CGGCACGCTC
61  GCCCTCGGCC TCACCGACGC CACCGCCAC GCCGCGCCCG CCCAGGCCAC TCCGACCCTG
121 GACTACGTCG CCCTCGGCGA CAGCTACAGC GCCGGCTCCG GCGTCCTGCC CGTCGACCCC
181 GCCAACCTGC TCTGTCTGCG CTCGACGGCC AACTACCCCC ACGTCATCGC GGACACGACG
241 GCGGCCCGCC TCACGGACGT CACCTGCGGC GCCGCGCAGA CCGCCGACTT CACGCGGGCC
301 CAGTACCCGG GCGTCGCACC CCAGTTGGAC GCGCTCGGCA CCGGCACGGA CCTGGTCACG
361 CTCACCATCG GCGGCAACGA CAACAGCACC TTCATCAACG CCATCACGGC CTGCGGCACG
421 GCGGGTGTCC TCAGCGGCGG CAAGGGCAGC CCCTGCAAGG ACAGGCACGG CACCTCCTTC
481 GACGACGAGA TCGAGGCCAA CACGTACCCG GCGCTCAAGG AGGCGCTGCT CGGCGTCCGC
541 GCCAGGGCTC CCCACGCCAG GGTGGCGGCT CTCGGCTACC CGTGGATCAC CCCGGCCACC
601 GCCGACCCGT CCTGCTTCCT GAAGTCCCC CTCGCCCGCG GTGACGTGCC CTACCTGCGG
661 GCCATCCAGG CACACCTCAA CGACGCGGTC CGGCGGGCCG CCGAGGAGAC CGGAGCCACC
721 TACGTGGACT TCTCCGGGGT GTCCGACGGC CACGACGCCT GCGAGGCCCC CGGCACCCGC
781 TGGATCGAAC CGCTGCTCTT CGGGCACAGC CTCGTTCCCG TCCACCCCAA CGCCCTGGGC
841 GAGCGGCGCA TGGCCGAGCA CACGATGGAC GTCCTCGGCC TGGACTGA

```


Figura 12

```

1 TCAGTCCAGG CCGAGGACGT CCATCGTGTG CTCGGCCATG CGCCGCTCGC CCAGGGCGTT
61 GGGGTGGACG GGAACGAGGC TGTGCCCGAA GAGCAGCGGT TCGATCCAGC GGGTGCCGGG
121 GGCCTCGCAG GCGTCGTGGC CGTCGGACAC CCCGGAGAAG TCCACGTAGG TGGCTCCGGT
181 CTCTCGGGCG GCCCGCCGGA CCGCGTCGTT GAGGTGTGCC TGGATGGCCC GCAGGTAGGG
241 CACGTCACCG GCGGCGAGGG GGAGCTTCAG GAAGCAGGAC GGGTCGGCGG TGGCCGGGGT
301 GATCCACGGG TAGCCGAGAG CCGCCACCTT GCGGTGGGGA GCCCTGGCGC GGACGCCGAG
361 CAGCGCCTCC TTGAGCGCGG GGTACGTGTT GGCCTCGATC TCGTCGTCTGA AGGAGGTGCC
421 GTGCCTGTCC TTGCAGGGGC TGCCCTTGCC GCCGCTGAGG ACACCCGCCG TGCCGCAGGC
481 CGTGATGGCG TTGATGAAGG TGCTGTTGTC GTTGCCGCCG ATGGTGAGCG TGACCAGGTC
541 CGTGCCGGTG CCGAGCGCGT CCAACTGGGG TGCGACGCCC GGSTACTGGG CCCGCGTGAA
601 GTCGGCGGTC TGC CGCGCGC CGCAGGTGAC GTCCGTGAGG CGGGCGCCCG TCGTGTCCGC
661 GATGACGTGG GGGTAGTTGG CCGTCGAGCG CAGACAGAGC AGGTTGGCGG GGTCGACGGG
721 CAGGACGCCG GAGCCGGCGC TG TAGCTGTC GCCGAGGGCG ACGTAGTCCA GGGTCGGAGT
781 GGCTGGGCG GCGCGGCGT GGGCGGTGGC GTCGGTGAGG CCGAGGGCGA GCGTGCCGAC
841 GCGGCGGACT GTCGCGGTCA TGACACGGCG AAGGGCAGGC TTCGGCAT

```

Figura 13

```

1  ATGGATTACG AGAAGTTTCT GTTATTTGGG GATTCCATTA CTGAATTGTC TTTAATACT
61  AGGCCATTG AAGATGGCAA AGATCAGTAT GCTCTTGGAG CCGCATTAGT CAACGAATAT
121  ACGAGAAAAA TGGATATTCT TCAAAGAGGG TTCAAAGGGT ACACTTCTAG ATGGGCGTTG
181  AAAATACTTC CTGAGATTTT AAAGCATGAA TCCAATATTG TCATGGCCAC AATATTTTGT
241  GGTGCCAACG ATGCATGCTC AGCAGGTCCC CAAAGTGTCC CCCTCCCCGA ATTTATCGAT
301  AATATTCGTC AAATGGTATC TTTGATGAAG TCTTACCATA TCCGTCTTAT TATAATAGGA
361  CCGGGGCTAG TAGATAGAGA GAAGTGGGAA AAAGAAAAAT CTGAAGAAAT AGCTCTCGGA
421  TACTTCCGTA CCAACGAGAA CTTTGCCATT TATTCCGATG CCTTAGCAAA ACTAGCCAAT
481  GAGGAAAAAG TTCCCTTCGT GGCTTTGAAT AAGGCGTTTC AACAGGAAGG TGGTGATGCT
541  TGGCAACAAC TGCTAACAGA TGGACTGCAC TTTTCCGGAA AAGGGTACAA AATTTTTCAT
601  GACGAATTAT TGAAGGTCAT TGAGACATTC TACCCCAAT ATCATCCCAA AAACATGCAG
661  TACAACTGA AAGATTGGAG AGATGTGCTA GATGATGGAT CTAACATAAT GTCTTGA

```

Figura 14

(SEC ID n° 12)

10	20	30	40	50	60
MNLRQWMGAA	TAALALGLAA	CGGGGTDQSG	NPNVAKVQRM	VVFGDSLSDI	GTYPVAQAV
70	80	90	100	110	120
GGGKFTTNP	PIWAETVAAQ	LGVTLTAVM	GYATSVQNC	KAGCFDYAQQ	GSRVTDPNGI
130	140	150	160	170	180
GHNGGAGALT	YPVQQQLANF	YAASNNTFNG	NNDVVEVLAG	SNDIFFWTTA	AATSGSGVTP
190	200	210	220	230	240
AIATAQVQQA	ATDLVGYVKD	MIAKGATQVY	VFNLPDSSLT	PDGVASGTTG	QALLHALVGT
250	260	270	280	290	300
FNTTLQSGLA	GTSARIIDFN	AQLTAAIQNG	ASEFGFANTSA	RACDATKINA	LVPSAGGSSL
310	320	330	340		
FCSANTLVAS	GADQSYLFAD	GVHPTTAGHR	LIASNVLARL	LADNVAH	

Figura 15

(SEC ID n° 13)

atgaacctgc	gtcaatggat	gggcgccgcc	acggctgccc	ttgccttggg	cttgcccgcg	60
tgcggggcg	gtgggaccga	ccagagcggc	aatcccaatg	tcgccaaggt	gcagcgcgatg	120
gtggtgttcg	gcgacagcct	gagcgatata	ggcacctaca	cccccgtcgc	gcaggcggtg	180
ggcggcggca	agttcaccac	caaccggggc	ccgatctggg	ccgagaccgt	ggccgcgcaa	240
ctgggcgtga	cgctcaegcc	ggcgggtgatg	ggctacgcca	cctccgtgca	gaattgcccc	300
aaggccggct	gcttcgacta	tgcgcagggc	ggctcgcgcg	tgaccgatec	gaacggcatc	360
ggccacaacg	gcggcgcggg	ggcgtgacc	taccgggttc	agcagcagct	cgccaacttc	420
tacgcggcca	gcaacaacac	attcaacggc	aataacgatg	tcgtcttcgt	gctggccggc	480
agcaacgaca	ttttcttctg	gaccactgcg	gcggccacca	gcggctccgg	cgtgacgccc	540
gccattgcca	cggcccaggt	gcagcaggcc	gcgacggacc	tggtcggcta	tgtcaaggac	600
atgatcgcca	aggggtgcgac	gcaggtctac	gtgttcaacc	tgcccgacag	cagcctgacg	660
ccggacggcg	tggcaagcgg	cacgaccggc	caggcgtgctg	tgcacgcgct	ggtgggcaag	720
ttcaacacga	cgctgcaaag	cgggctggcc	ggcacctcgg	cgcgcatcat	cgacttcaac	780
gcacaactga	ccgcggcgat	ccagaatggc	gcctcgttcg	gcttcgcca	caccagcgcc	840
cgggcctgcg	acgccaccaa	gatcaatgcc	ctggtgccga	gcgccggcgg	cagctcgctg	900
ttctgctcgg	ccaacacgct	ggtggcttcc	ggtgcggacc	agagctacct	gttcgccgac	960
ggcgtgcacc	cgaccacggc	cggccatcgc	ctgatcgcca	gcaacgtgct	ggcgcgcctg	1020
ctggcggata	acgtcgcgca	ctga				1044

Figura 16 (SEC ID n° 20)

```

1 migsyvavgd sftegvgdpg pdgafvgwad rlavlladdr pegdftytnl avrgrlldqi
61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpgt dpdevaerfe lavaaltaaa gtvlvttgfd
121 trgvpvkhl rgkiatyngv vraiadrygc pvldlwslrs vqdrrawdada rhlhspeght
181 rvalraggal glrvpadpdq pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
241 hvtakgtlsp daiktriaav a

```

Figura 17 (SEC ID n° 21)

```

1 gtgatcgggt cgtacgtggc ggtgggggac agcttcaccg agggcgtcgg cgaccccggc
61 cccgacgggg cgttcgtcgg ctggggccgac cggctcgccg tactgctcgc ggaccggcgc
121 cccgagggcg acttcacgta cacgaacctc gccgtgcgcg gcaggctcct cgaccagatc
181 gtggcggaac aggtcccgcg ggtcgtcggc ctgcgcgccg acctcgtctc gttcgcggcg
241 ggcggcaacg acatcatecg gcccgccacc gatcccgcag aggtcgccga gcggttcgag
301 ctggcggtgg ccgcgctgac cgcgcggcgc ggaaccgtcc tggtgaccac cgggttcgac
361 acccgggggg tgcccgtcct caagcacctg cgcggcaaga tcgccacgta caacgggcac
421 gtccgcgcca tcgccgaccg ctacggctgc ccgggtgctc acctgtggtc gctgoggagc
481 gtccaggacc gcagggcgtg ggacgcccgc cggctgcacc tgtcgccgga ggggcacacc
541 cgggtggcgc tgcgcgcggg gcagggcctg ggcctgcgcg tcccggccga ccctgaccag
601 ccctggccgc ccctgcccgc gcgcggcagc ctgcagctcc ggcgcgacga cgtgcactgg
661 gcgcgcgagt acctggtgcc gtggatcggg cgcgcgctgc ggggcgagtc gtcggggcgc
721 cacgtgacgg ccaaggggac gctgtcgccg gacgccatca agacgcggat cgcgcgggtg
781 gcctga

```

Figura 18
(SEC ID n° 22)

```

1  mqtnpaytsl  vavgdsfteg  msdllpdgsy  rgwadllatr  maarspgfry  anlavrgkli
61  ggivdeqvdv  aaamgadvit  lvgglnhdlr  pkcdmarvrd  lltqaverla  phceqlvlmr
121 spgrqgpvle  rfrprmealf  aviddlagrh  gavvvdlyga  qsladprmwd  vdrhlhtaeg
181 hrrvaeavwq  slghepedpe  whapipatpp  pgwvtrrtad  vrfarqhllp  wigrrltgrs
241 sgdglpakrp  dllpyedpar

```

Figura 19 (SEC ID n° 23)

```

1  atgcagacga  accccgcgta  caccagtctc  gtcgccgtcg  gcgactcctt  caccgagggc
61  atgtcggacc  tgctgcccga  cggctcctac  cgtggctggg  cgcacctcct  cgccaccggg
121 atggcggccc  gctccccggg  cttccggtag  gccaacctgg  cggtgccggg  gaagctgacg
181 ggacagatcg  tcgacgagca  ggtggacgtg  gccgccgcca  tgggagccga  cgtgatcacg
241 ctggtcggcg  ggctcaacga  cacgctgcgg  cccaagtgeg  acatggcccc  ggtgcgggac
301 ctgctgacct  aggccgtgga  acggctcgcc  ccgactgcg  agcagctggt  gctgatgccc
361 agtcccggtc  gccagggtec  ggtgctggag  cgcttccggc  cccgcatgga  ggccctgttc
421 gccgtgatcg  acgacctggc  cgggcggcac  ggcgccgtgg  tcgtcgacct  gtacggggcc
481 cagtcgctgg  ccgacctcgg  gatgtgggac  gtggaccggc  tgcacctgac  cgccgagggc
541 caccgccggg  tcgcgaggcc  ggtgtggcag  tcgctcggcc  acgagccccg  ggacccccag
601 tggcacgcgc  cgatcccggc  gacgccggcc  ccggggtggg  tgacgcgcag  gaccgcggac
661 gtccggttcg  cccggcagca  cctgctgccc  tggataggcc  gcaggctgac  cgggcgctcg
721 tccggggacg  gcctgcggcc  caagcggccc  gacctgctgc  cctacgagga  ccccgcacgg
781 tga

```

Figura 20 (SEC ID n° 24)

```

1 mtrgrdggag apptkhrall aaivtlivai saaiyagasa ddgsrdhalq aggrlprgda
61 apastgawvg awatapaaae pgtettglag rsvrnvhts vggagaritl snlygqsplt
121 vthasialaa gpdtaaaiaad tmrrltfggs arviipaggg vmsdtarlai pyganvlvtt
181 yspipsgpvt yhpqarqtsy ladgdrtdv tavayttptp ywryltaldv lsheadgtvv
241 afgdsitdga rsqsdanhrw tdvlaarlhe aagdgrdtpr ysvvnegisg nrlltsrpgr
301 padnpsglsr fqrdrvlerntn vkavvvvlgv ndvlnspela drdailtglr tlvdraharg
361 lrvvgatitp fggygytea retmrqevne eirsgrvfdt vvdfdkalrd pydprmrdsd
421 ydsghlhpq dkgyarmgav idlaalkgaa pvka

```

Figura 21 (SEC ID n° 25)

```

1 atgaccggg gtcgtgacgg gggtgccggg gcgccccca ccaagcaccg tgccctgctc
61 gcggcgatcg tcaccctgat agtggcgatc tccgcggcca tatacgccgg agcgtccgcy
121 gacgacggca gcagggacca cgcgctgcag gccggaggcc gtctcccacg aggagacgcc
181 gccccgcgt ccaccggtgc ctgggtgggc gcctgggcca ccgacccggc cggggccgag
241 ccgggcaccg agacgaccgg cctggcgggc cgctccgtgc gcaacgtcgt gcacacctcg
301 gtcggcggca ccggcgcgcg gatcaccctc tcgaacctgt acgggcagtc gccgctgacc
361 gtcacacacg cctcgatcgc cctggccgccc ggcccgcaca ccgcccggc gatcgccgac
421 accatgcgcc ggctcacctt cggcggcagc gcccggtga tcatcccggc gggcggccag
481 gtgatgacgg acaccgccc cctcgccatc ccctacgggg cgaacgtcct ggtcaccacg
541 tactccccca tcccgtccgg gccggtgacc taccatccgc aggcccgga gaccagctac
601 ctggccgacg gcgaaccgac ggccgacgtc accgcccgtc cgtacaccac ccccacgccc
661 tactggcgct acctgaccgc cctcgacgtg ctgagccacg aggccgacgg cacggctcgtg
721 gcgttcggcg actccatcac cgacggcgcc cgctcgaga gcgacgcca ccaccgctgg
781 accgacgtcc tccgcccacg cctgcacgag gcggcgggcy acggcccggga cacgccccgc
841 tacagcgctc tcaacgaggg catcagcggc aaccggctcc tgaccagcag gccggggcgg
901 ccggccgaca acccgagcgg actgagccgg ttccagcggg acgtgctgga acgcaccaac
961 gtcaaggccg tcgtcgtcgt cctcggcgtc aacgacgtcc tgaacagccc ggaactcgcc
1021 gaccgacgac ccatectgac cggcctgcgc accctcgtc acggggcgca cggccgggga
1081 ctgcccggctc tcggcgccac gatcacgccc ttcggcggct acggcgggta caccgagggc
1141 cgcgagacga tgcggcagga ggtcaacgag gagatccgct ccggcccggg cttcgacacg
1201 gtcgtcgact tcgacaaggc cctgcgcgac ccgtacgacc cgcgcccgat gcgctccgac
1261 tacgacagcg gcgaccacct gcaccccggc gacaaggggt acgcccgcac gggcgcggtc
1321 atcgacctgg ccgcgctgaa gggcgcggcg ccggtcaagg cgtag

```

Figura 22 (SEC ID n° 26)

```

1 mtsmsrarva rriaagaayg gggiglagaa avglvvaevq larrrvvgvt ptrvpnaqgl
61 yggtlptagd pplrlmmlgd staagggvhr agqtpgalla sglaavaerp vrlgsvaqpg
121 acsddldrvq alvlaepdrv pdicvimvga ndvthmpat rsvrhlssav rrlrtagaev
181 vvgtcpdlgt iervrqplrw larrasrqla aaqtigaveq ggtrvslgdl lgpefaqnpr
241 elfgpdnyhp saegyataam avlpsvcaal glwpadeehp dalrregflp varaaaaaas
301 eagtevaaam ptgprgpwal lkrrrrrrvs eaepsspsgv

```

Figura 23 (SEC ID n° 27)

```

1 atgacgagca tgtcgagggc gagggtggcg cggcggatcg cggccggcgc ggcgtacggc
61 ggcggcggca tcggcctggc gggagcggcg gcggtcggtc tgggtggggc cgaggtgcag
121 ctggccagac gcaggggtggg ggtgggcacg ccgaccggg tgccgaacgc gcagggactg
181 tacggcggca ccctgcccac ggccggcgac ccgccgctgc ggctgatgat gctgggacgac
241 tccacggccg cggggcaggg cgtgcaccgg gccgggcaga cggcgggcgc gctgctggcg
301 tccgggctcg cggcgggtggc ggagcggccg gtgcggctgg ggtcggctgc ccagccgggg
361 gcgtgctcgg acgacctgga ccggcaggtg gcgctggtgc tcgccgagcc ggaccgggtg
421 cccgacatct gcgtgatcat ggtcggcgcc aacgacgtca cccaccggat gccggcgacc
481 cgctcgggtc ggcaacctgc ctcggcggta cggcggctgc gcacggccgg tgcggaggtg
541 gtggtcggca cctgtccgga cctgggcacg atcgagcggg tcgggcagcc gctgcgctgg
601 ctggcccggc gggcctcacg gcagctcgcg gcggcacaga ccatcggcgc cgtcgagcag
661 ggcggcggca cgggtgctcgt gggcgacctg ctgggtccgg agttcgcgca gaaccgcgg
721 gagctcttcg gccccgacaa ctaccacccc tccgccgagg ggtacgccac ggccgcgatg
781 gcggtactgc cctcgggtgtg cgccgcgctc ggcctgtggc cggccgacga ggagcaccg
841 gacgcgctgc gccgcgaggg ctctctgccg gtggcgcgcg cggcggcgga ggcggcgtcc
901 gaggcgggta cggaggtcgc cgccgccatg cctacggggc ctcgggggcc ctgggcgctg
961 ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgtcg gaggcggaac cgtccagccc gtccggcgtt
1021 tga

```


Figura 24 (SEC ID n° 28)

```

1 mgrgtdqrtr ygrrrarval aaltaavlgv gvagcdsvgg dspapsgsps krtrtapawd
61 tspasvaavg dsitrgrfdac avlsdcpevs watgssakvd slavrlilgka daaehswana
121 vtgarmadlt aqvtraaqre pelvavmaga ndacrsttsa mtpvadfraa feeamatlrk
181 klpkavvyvs sipdlkrlws qgrtnplgkq vwklglcpsm lgdadslds atlrrntvrd
241 rvadynevlr' evcakdrxr sddgavhefr fgtdqlshwd wfhpsvdgqa rlaeiayrav
301 taknp

```

Figura 25 (SEC ID n° 29)

```

1 atgggtcgag ggacggacca cgggacgagg tacggccgct gccgggagcg tgcgagctc
61 gccgcccctga ccgcccgggt cctggggcgtg ggcgtggcgg gctgcgactc cgtgggagcg
121 gactcaaccg ctcttccgg cagcccgtcg aagcggacga ggacggcgcc cgctgggac
181 accagcccgg cgtccgtcgc cgccgtgggc gactccatca cgcgaggctt cgacgcctgt
241 gcggtgctgt cggactgccc ggaggtgctg tgggagaccg gcagcagcgc gaaggtcgac
301 tcgctggcgg tacggctgct ggggaaggcg gacgagccg agcacagctg gaactacgag
361 gtcaccgggg cccgatggc ggacctgacc gctcaggtga cgcgggagcg gcagcgcgag
421 ccggagctgg tggcggatgat ggccggggcg aacgacgctg gccggtccac gacctcggcg
481 atgacgccgg tggcggactt ccgggagcag ttcgaggagg cgatggccac cctgcgcaag
541 aagctcccca aggcgcaggt gtacgtgctg agcatcccgg acctcaagcg gctctggtcc
601 cagggccgca ccaaccgct gggcaagcag gtgtggaagc tcggcctgtg cccgtcgatg
661 ctgggagcag cggactccct ggactcggcg gcgaccctgc ggcgcaacac ggtgcgagc
721 cgggtggcgg actacaacga ggtgctgagg gaggtctgag cgaaggaccg gcggtgccc
781 agcagcagc gcgcgggtgca cgagttccgg ttcggcagcg accagttgag ccaactgggac
841 tggttccacc cgagtgtgga cggccagggc cggctggcgg agatcgccca ccgagcggc
901 accgcaaga atccctga

```

Figura 26 (SEC ID n° 30)

```

1 mrlsrraata sallltpala lfgasaavsa priqatdyva lgdsyssgvq agsydsssgs
61 ckrstksypa lwaashtgtr fnftacsgar tgdvlakqlt pvnsqtdlvs itiggndagf
121 adtmttcnlq gesaclaria karayiqqt1 paqldqvyda idsrapaaqv vvlgyprfyk
181 lggscavglis eksraainaa addinavtak raadhgfafg dvnttfaghe lcsgapwlhs
241 vtlpvensyh ptangqskgy lplvlnsat

```

Figura 27 (SEC ID n° 31)

```

1 ttcatacaaa cgatgtcaca acaccggcca tccgggtcat ccctgatcgt gggaaatgggt
61 gacaagcctt cccgtgacga aaggggtcctg ctacatcaga aatgacagaa atcctgctca
121 gggaggttcc atgagactgt cccgacgcgc ggccacggcg tccgcgctcc tcctcacccc
181 ggcgctcgcg ctcttcggcg cgagcgcgcg cgtgtccgcg ccgcgaatcc aggccaccga
241 ctacgtggcc ctcggcgact cctactcctc gggggtcggc gcgggcagct acgacagcag
301 cagtggctcc tgtaagcgca gcaccaagtc ctaccggcc ctgtgggccc cctcgcacac
361 cggtaecggg ttcaacttca ccgcctgttc gggcgcccgc acaggagacg tgctggccaa
421 gcagctgacc ccggtcaact ccggcaccga cctggtcagc attaccatcg gcggcaacga
481 cgcgggcttc gccgacacca tgaccacctg caacctccag ggcgagagcg cgtgcctggc
541 gcggatcgcc aaggcgcgcg cctacatcca gcagacgctg cccgcccagc tggaccaggt
601 ctacgacgcc atcgacagcc gggccccgc agcccaggtc gtcgtcctgg gctacccgcg
661 cttctacaag ctgggcggca gctgcgccgt cggctctctg gagaagtccc gcgcggccat
721 caacgccgcc gccgacgaca tcaacgccgt caccgccaag cgcgcgcgcg accacggctt
781 cgccttcggg gacgtcaaca cgacctcgc cgggcacgag ctgtgctcgg gcgccccctg
841 gctgcacagc gtcacccttc ccgtggagaa ctctaccac cccacggcca acggacagtc
901 caagggctac ctgcccgtcc tgaactccgc cacctgatct cgcggctact ccgcccctga
961 cgaagtcccg cccccggcg gggcttcgcc gtaggtgcgc gtaccgccgt cgccccctgc
1021 gccggtgccc ccgccgtacg tgccgcgcgc cccggacgcg gtcggttc

```

Figura 28 (SEC ID nº 32)

```
1  MKKWFVCLLG LVALTVQAAD SRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51  SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNPK
101 YQVINNL DYE VTQFLQK DSE KPDDL VILWV GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
151 DAISDAANRM VLNKAKQILL FNLPDLGQNP SARSQKVVEA VSHVSAYHNO
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMA RRSASPLNCE
301 GKMEWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIANQY EFLAH*
```

Figura 29 (SEC ID nº 33)

```

1  ATGAAAAAAT  GGTTTGTGTG  TTTATTGGGA  TTGGTCGCGC  TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA  CCAAACACAC  AAATAACCCT  AACCAGCGCG  ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC  AGTCGCCCGG  CCTTTTCCCG  GATCGTGATG  TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG  TCAGCGGGGC  GGAAAAGGGC  CTAGCACTAC  AAGCCGCTGT

101  GCCTCTCCGA  TACCGGCAAA  ATGTACAGCA  AGATGCGCGG  TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT  ATGGCCGTTT  TACATGTCGT  TCTACGCGCC  AATGGAGGGG

151  TCCAGCCCGC  CCTACTATGA  GGGCCGTTTC  TCCAACGGAC  CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG  GGATGATACT  CCCGGCAAAG  AGGTTGCCTG  GGCAGACCGA

201  GGAGCAGCTG  ACCAAACAGT  TCCCGGGTCT  GACCATCGCC  AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC  TGGTTTGTCA  AGGGCCAGAG  CTGGTAGCGG  TTGCTTCGCC

251  AAGCGGGTGC  CACTGCCGTG  GCTTACAACA  AGATCTCCTG  GAATCCCAAG
   TTCGCCACG  GTGACGGCAC  CGAATGTTGT  TCTAGAGGAC  CTTAGGGTTC

301  TATCAGGTCA  TCAACAACCT  GGACTACGAG  GTCACCCAGT  TCTTGCAGAA
   ATAGTCCAGT  AGTTGTTGGA  CCTGATGCTC  CAGTGGGTCA  AGAACGTCTT

351  AGACAGCTTC  AAGCCGGACG  ATCTGGTGAT  CCTCTGGGTC  GGTGCCAATG
   TCTGTGGAAG  TTCGGCCTGC  TAGACCACTA  GGAGACCCAG  CCACGGTTAC

401  ACTATCTGGC  CTATGGCTGG  AACACGGAGC  AGGATGCCAA  GCGGGTTCGC
   TGATAGACCG  GATACCGACC  TTGTGCCTCG  TCCTACGGTT  CGCCCAAGCG

451  GATGCCATCA  GCGATGCGGC  CAACCGCATG  GTACTGAACG  GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT  CGCTACGCCG  GTTGGCGTAC  CATGACTTGC  CACGGTTCGT

501  GATACTGCTG  TTCAACCTGC  CGGATCTGGG  CCAGAACCCG  TCAGCTCGGA
   CTATGACGAC  AAGTTGGACG  GCCTAGACCC  GGTCTTGGGC  AGTCGAGCGT

551  GTCAGAAGGT  GGTCGAGGCG  GTCAGCCATG  TCTCCGCCTA  TCACAACCAG
   CAGTCTTCCA  CCAGCTCCGC  CAGTCGGTAC  AGAGGCGGAT  AGTGTGGTTC

601  CTGCTGCTGA  ACCTGGCAGC  CCAGCTGGCC  CCCACCGGCA  TGGTAAAGCT
   GACGACGACT  TGGACCGTGC  GGTGACCGGG  GGGTGGCCGT  ACCATTTCGA

651  GTTCGAGATC  GACAAGCAAT  TTGCCGAGAT  GCTGCGTGAT  CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG  CTGTTGTTA  AACGGCTCTA  CGACGCACTA  GGGCTCTTGA

701  TCGGCCGAG  CGACGTCGAG  AACCCTGCT  ACGACGGCGG  CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC  GCTGCAGCTC  TTGGGGACGA  TGCTGCCGCC  GATACACACC

751  AAGCCGTTTG  CCACCCGAG  CGTCAGCACC  GACCGCCAGC  TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAAC  GGTGGGCGTC  GCAGTCGTGG  CTGGCGGTGC  AGAGGCGGAA

801  CAGTCCGAG  GAACGCCTCG  CCATCGCCGG  CAACCCGCTG  CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC  CTTGCGGAGC  GGTAGCGGCC  GTTGGGCGAC  GACCGTGTCC

851  CCGTTGCCAG  TCCTATGGCC  CGCCGAGCG  CCAGCCCCCT  CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC  AGGATACCGG  GCGGCCTCGC  GGTGCGGGGA  GTTGACTACT

901  GGCAAGATGT  TCTGGGATCA  GTACACCCG  ACCACTGTGC  TGCACGCAGC
   CCGTTCTACA  AGACCCTAGT  CCATGTGGGC  TGGTGACAGC  ACGTGCCTGC

951  CCTGAGCGAG  CGCGCCGCCA  CCTTCATCGC  GAACCAAGTAC  GAGTTCCCTCG
   GGACTCGCTC  GCGCGGCGGT  GGAAGTAGCG  CTTGGTCATG  CTCAAGGAGC

1001  CCCAC TGA
      GGGTG ACT

```

Figura 30 (SEC ID nº 34)

```
1 MKKWFVCLLG LIALTVQAAD TRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51 SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNP
101 YQVINNLDYE VTQFLQKDSF KPDDLVLWV GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
151 DAISDAANRM VLNGAKQILL FNLPLGQNP SARSQVVEA VSHVSAYHNK
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMA RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIETQY EFLAHG*
```

Figura 31 (SEC ID nº 35)

```

1  ATGAAAAAAT GGT TTGTTG TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA CCAAACAAAC AAATAACCCC AACTAGCGCG ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC ACTCGCCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TGAGCGGGGC GGAAGAGGGC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCCTCTCCGA TACCGGCAAA ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGGCCGTTT TACATGTCGT TCTACGCGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCAACGGAC CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG GGATGATACT CCCGGCAAAG AGGTTGCTTG GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCGGGTCT GACCATCGCC AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC TGGTTCGTCA AGGGCCAGA CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGCGGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
   TTCCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTTGT TCTAGAGGAC CTTAGGGTTC

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GACTACGAG GTCACCCAGT TCTGTCAGAA
   ATAGTCCAGT AGTTGTTGGA CCTGATGCTC CAGTGGGTCA AGAACGTCTT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTGGAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC ATATGGCTGG AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTCCG
   TGATAGACCG TATACCGACC TTATGCCTCG TCCTACGGTT CGCTCAAGCG

451 GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GACTGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGCTACGCCG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCGT

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCG TCAGCCCGCA
   CTATAGACGAC AAGTTGGACG GCCTAGACCC GGTCTTGGGC AGTCGGGCGT

551 GTCAGAAGGT GTCGAGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCTA TCACAACAAG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTGTTTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCGG GGGTGGCCGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTGTTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GGCCTTTGA

701 TCGGCTGAG CGACGTCGAG AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC GCTGCAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTTG CCACCCGAG CGTCAGCACC GACCGCCAGC TCTCCGCTT
   TTCGGCAAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTCG AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGAG GAACGCCTCG CCATCGCCG CAACCCGCTG CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC CTTGCGGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GACCGTGTCC

851 CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGAGCG CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC AGGATACCGG GCGGCGTCG GGTGCGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTG TGCACGCAGC
   CCGTTCTACA AGACCCTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACGTGCCTCG

951 CCTGAGCGAG CGCGCCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC GCGCGGCGGT GGAAGTAGCT CTGGGTCATG CTCAAGGAGC

1001 CCCACGGATG A
      GGGTGCCTAC T

```

Figura 32

```

      1      10      20      30      40      50
      |-----+-----+-----+-----+-----|
  satA  ADTRPAFSRIYMFGDSLSDTGKHYSKMRGYLPSSPPYYEGRFSN--G
  R_sol QSGNPNYAKYQRMVYVFGDSLSDIGT-----YTPYAQAVGGGKFTTNP
  Consenso ...adnraafqRiYnFGDSLSDiGk.....YlPsaqaygeGrFsn..G

      51      60      70      80      90      100
      |-----+-----+-----+-----+-----|
  satA  PYMLEQLTKQFPGLTIANEAEGGATAYAYNKISHNPKYQVINLDYEYV
  R_sol PIWAETVAAQL-GVTLTPAVHGYATSQNCPKAGCFDYAQGGSRYTDPNG
  Consenso P!HaEq1aaQ1.GlTianaaeGgATaYannkiagnfdYaqqnrdt.#pnq

     101     110     120     130     140     150
     |-----+-----+-----+-----+-----|
  satA  FLQKDSFKPDDLVLWYGANDYLAYG--WNTQQDAKRYRDAISDAANRMY
  R_sol IGHNGGAGALTPYVQQQLANFYASNNTFNGNNDVYFVLAGSNDIFFHTT
  Consenso igqndgagaddlp!qqqgANdYafsn..fNg##DakrYraainDaanrnt

     151     160     170     180     190     200
     |-----+-----+-----+-----+-----|
  satA  LNGAKQILLFNLPLDQGQNSARSQKYVEAYSHYSAYHNKL--LLNLARQLA
  R_sol AARTSGSGYTPAIATAQVQQARTDLYGYVKDHIKAGATQVYVFNLPDSSL
  Consenso aaaakqiglfnaialaQnqqfAs#lVgeakdh!aaganql.l1NLaqla

     201     210     220     230     240     250
     |-----+-----+-----+-----+-----|
  satA  PTGMYKLFKQFAEHLRDPQNFGLSDYENPCYDGGYVWKPFATRSYST
  R_sol TPDGYASGTTGQALLHALYGTFTTLQSGLAGTSARIIDFNAQLTAAIQN
  Consenso ppdgValgeidqalaeaLrdpqNfgLqdgeagcsargidfnaqaTaa!qn

     251     260     270     280     290     300
     |-----+-----+-----+-----+-----|
  satA  DRQLSAFSPQERLAIAG--NPLLAQAVASPM---ARRSASPLNCEGKNFM
  R_sol GASFGFANTSARACDARKINALYPSAGGSSLFCSANTLYASGADQSYLFA
  Consenso daqlgaanpqaRaadAg..NaLlaqfagaSp$....Arrlaapgad#gk$Fa

     301     310     320     330
     |-----+-----+-----|
  satA  DQVHPTTYVHAALSERAAFTIETQYEFLAH
  R_sol DGVHPTTAGHRLIASNYLARLLA--DNVAH
  Consenso DqVHPTTagHaaiaeraaariae..#n1AH
  
```

Figura 33

Pfam	*->ivafGDSltgqg.....ayygdsgggwgagladrltsla..rlrargrvdv	
Srim1	38 YVALGDSYSSGVG.....agSYDSSSGSCKRSTKSYPALWAAS..----HTGTRF	81
Scoe1	5 YVAVGDSFTEG--.....--VGDPGPDGAFVWADRLAVLL..ADRRPEGDFTY	47
Scoe2	10 LVAVGDSFTEG--.....--MSDLLPDGSYRGWADLLATRM..--AARSPGFRY	50
Scoe3	239 VVAVGDSITDG--.....ARSQSDANHRWTDVLAARLHEAA..GDGRDTPRYSV	283
Scoe4	75 LMMLGDSTAAG--.....-----QGVHRAGQTPGALLASG..LAAVAERPVR	113
Scoe5	66 VAAVGDSITRGFD.....acAVLSDCPEVSWATGSSAKVDSLAvrLLGKADAAEHS	116
Ahyd1	28 IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpssppyYEGRFNPGPVWLEQLTNEFPGLTIANEAEGGPTAVA	91
Asall	28 IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpssppyYEGRFNPGPVWLEQLTKQF-----PGLTI	79
Ahyd2	40 IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpssppyYEGRFNPGPVWLEQLTKQFPGLTIANEAEGGATAVA	103
▼		
Pfam	fnrgisGrtsdGrlvvDarlvatlFlaqflGlnlpPYLsgdflrGANFasagAtIlgtslipflni	
Srim1	82 NFTACSGAR-----	90
Scoe1	48 TNLAVRGRL-----	56
Scoe2	51 ANLAVRGKL-----	59
Scoe3	284 VNEGISGNR-----	292
Scoe4	114 GSVAQPGAC-----	122
Scoe5	117 WNYAVTGAR-----	125
Ahyd1	92 YNKISWNP-----	100
Asall	80 ANEAEGGAT-----	88
Ahyd2	104 YNKISWNP-----	112
▼		
Pfam	QvqFkdfkskvlelrqa.....lgllqellrlvpvldakspdlvtimiGtND1...itvakfgpks	
Srim1	91 -----TGDVLAQQLTPVNSGTDLVSITIGGNDagfadTMTTCNLQG	131
Scoe1	57 -----LDQIVAEQVPRVVLAPDLVSFAAGNDI...-----I-----	86
Scoe2	60 -----IGQIVDEQVDVAAAMGADVITLVGGNDT...-----	88
Scoe3	293 -----LLTSRPGRPA.....DNPSGLSRFQRDVLERTNVKAVVVVLGVNDV...-----	333
Scoe4	123 -----SDDLDRQVALVLAEPDRVPDICVIMVGANDV...-----	153
Scoe5	126 -----MADLTAQVTRAAQREPELVAVMAGANDA...-----CR	155
Ahyd1	101 -----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY...-----LA	137
Asall	89 -----AVAYNKISWNPkyqvyNNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY...-----LA	137
Ahyd2	113 -----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY...-----LA	149
▼		
PfamtksdnrvsvpefrdnlrklikrLrsangariiiilitlVllnpl.....pIGCl	
Srim1	132 esaclarIAKARAYIQQLPAQLDQVYDAIDSRAPAA-----QVVVLGYP-----	176
Scoe1	87 -----RPGTDPDEVAERFELAVAALT-AAAGTVLVTTGFDTRGVP-----	125
Scoe2	89 -----LRPKCDMARVRDLLTQAVERLAPHCEQLVLMRSP-----	122
Scoe3	334 -----LNSPELADRDAILTGLRTLVDRAHARGLRVVGATITPFGGYGG-----	376
Scoe4	154 -----THRMPATRSVRHLSSAVRRLR-TAGAEVVVGTCPDLGTIE-----	192
Scoe5	156 -----STTSAMTPVADFRAQFEAMATLR-KKLPKAQVYVSSIPDLKRLwsqgrtnplgkQVWKL	214
Ahyd1	138 -----YGWNTQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----EILLFNLP-----	174
Asall	138 -----YGWNTQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLP-----	174
Ahyd2	150 -----YGWNTQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLP-----	186
▼		
Pfam	pq.klalalassknvdatgclerlneavadynealrelaei.ek.1.q.aqlrkdglpdlkeanvpy	
Srim1	177 --.RFYKLGGSACAVGLSEKSRAAINAAADDINAVTAKRA--.--.--ADHGFAF	219
Scoe1	126 --.-----VLKHLRGKIATYNGHVRAIA--.--.--DRYGCPV	152
Scoe2	123 --.-----GRQGPVLERFRPRMEALFAVIDDLA--.--.--GRHGAVV	154
Scoe3	377 --.YTEARETMROEVNEEIRSGRVFDTVVDFDKALRDPY--.--.--412	
Scoe4	193 --.-----RVRQPLRWLaRraSrQlAAAQTIGAVEQGGRTVSL	227
Scoe5	215 GLcPMSMLGDADSLDSAATLRRNTVRDRVADYNEVLEVC--.--.--AkDRRCRSDDGAVHEFRFQT	273
Ahyd1	175 --.-----DLGQNPSARSQKVVEAASHVSAYHNQLLNLA--.--.--RQLAPTGMVKLFEIDKQF	224
Asall	175 --.-----DLGQNPSARSQKVVEAVSHVSAYHNKLLLNLA--.--.--RQLAPTGMVKLFEIDKQF	224
Ahyd2	187 --.-----DLGQNPSARSQKVVEAVSHVSAYHNQLLNLA--.--.--RQLAPTGMVKLFEIDKQF	236
▼		
Pfam	Vdlyisifqldgignpsayv.y....GFeet.kaCCGyGgr.yNyn.rv.CGnag.l.ck.vtakaC	
Srim1	220 GDVNT-----TFAGHELCSGAPwL.HS.VT----	242
Scoe1	153 LDLWSLRSVQDRRA-----	166
Scoe2	155 VDLYGAQSLADPRM-----	168
Scoe3	413 -----	413
Scoe4	228 GDLLGPEFAQNPREL-----	242

Scoe5 274 DQL-----.....------.------.------.----- 276
 Ahyd1 225 AEMLRDPQNFGLSDQRNACYgGsyvwKPFASrSASTDSQLSaFNPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMMA 291
 Asal1 225 AEMLRDPQNFGLSDVENPCYdGgyvwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR 291
 Ahyd2 237 AEMLRDPQNFGLSDVENPCYdGgyvwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR 303



Pfam .dassy11.atlfdGf.HpsekGykavAeal<-*
 Srim1 243 .-----.--LPVENSyHPTANGQSKGYLPV 263
 Scoe1 167 .-----.--WDADRL.HLSPEGHTRVALRA 186
 Scoe2 169 .-----.--WDVDRL.HLTAEGHRRVAEAV 188
 Scoe3 413 .-DPRRMRsDYDSGDHL.HPGDKGYARMGAVI 441
 Scoe4 243 .-----.--FGPDNY.HPSAEGYATAAMAV 262
 Scoe5 277 .-----.--SHWDWF.HPSVDGQARLAEIA 296
 Ahyd1 292 rSASTLNcCeGKMFDQV.HPTTVVHAALSEPA 322
 Asal1 292 rSASPLNcCeGKMFDQV.HPTTVVHAALSERA 322
 Ahyd2 304 rSASPLNcCeGKMFDQV.HPTTVVHAALSERA 334

Figura 34

		▼	
Pfam		*->ivafGDSltdggg.....ayygdsgggwgagladrltsla..rlrargrgv	
Srim1	38	YVALGDSYSSGVG.....agSYDSSSGSKRSTKSYPALWAAS..-----HTGTRF	81
Scoe1	5	YVAVGDSFTEG--.....--VGDPGPDGAFVWADRLAVLL..ADRRPEGDFTY	47
Scoe2	10	LVAVGDSFTEG--.....--MSDLLPDGSYRGWADLLATRM..--AARSPGF	50
Ahyd1	28	IVMFGDSLSDTGKmyskmyrgylpsppyyEGRFSNGPVWLEQLTNEFPGLTianEAEGGPTAVA	91
Asa11	28	IVMFGDSLSDTGKmyskmyrgylpsppyyEGRFSNGPVWLEQLTKQF-----PGLTI	79
Ahyd2	40	<u>IVMFGDSLSDTGKmyskmyrgylpsppyyEGRFSNGPVWLEQLTKQFPGLTianEAEGGATAVA</u>	103
Pfam		fnggisGrtsdGrlvvDarlvatl1FlaqflGlnipPYLsgdflrGANFAsagAtIlgtslipflni	
Srim1	82	NFTACSGAR-----	90
Scoe1	48	TNLAVRGRL-----	56
Scoe2	51	ANLAVRGKL-----	59
Ahyd1	92	YNKISWNP-----	100
Asa11	80	ANEAEGGAT-----	88
Ahyd2	104	YNKISWNP-----	112
		▼	
Pfam		QvqFkdfkskvlrlqa.....lglqlrllrvpvidakspdlvtimiGtND1...itvakfgpks	
Srim1	91	-----TGDVLAKQLTPVNSGTDLVSITIGNDagfadTMTTCNLQG	131
Scoe1	57	-----LDQIVAEQVPRVVLAPDLVSFAAGGNDI...-----I-----	86
Scoe2	60	-----IGQIVDEQVDVAAMGADVITLVGGLNDT...-----	88
Ahyd1	101	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY...-----LA	137
Asa11	89	-----AVAYNKISWNPkyqvynNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY...-----LA	137
Ahyd2	113	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY...-----LA	149
Pfam	tksdrrnsvpefrdnrlrklkrLrsangariiiilitl1vllnplplGCl	
Srim1	132	esaclarIAKARAYIQQLPAQLDQVDAIDSRAPAA-----QVVVLGYP-----	176
Scoe1	87	-----RPGTDPDEVAERFELAVAALT-AAAGTVLVTGFDTRGVP-----	125
Scoe2	89	-----LRPKCDMARVRLDLTQAVERLAPHCEQLVLMRSP-----	122
Ahyd1	138YGWNTQDAKRVDAISDAANRMV-LNGAK-----EILLENLP-----	174
Asa11	138YGWNTQDAKRVDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLENLP-----	174
Ahyd2	150YGWNTQDAKRVDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLENLP-----	186
Pfam		pqklalalassknvdatgclerlneavadynealrelaeieklqaqlrkdglpdlkeanvpy	
Srim1	177	--RFYKLGGSACAVGLSEKSRAAINAAADDINAVTAKRA-----ADHGFAF	219
Scoe1	126	-----VLKHLRGKIATYNGHVRAIA-----DRYGCVP	152
Scoe2	123	-----GRQGPVLERFRPMEALFAVIDDLA-----GRHGAVV	154
Ahyd1	175	-----DLGQNPSARSQVVEAASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDKQF	224
Asa11	175	-----DLGQNPSARSQVVEAVSHVSAYHNKLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDKQF	224
Ahyd2	187	-----DLGQNPSARSQVVEAVSHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDKQF	236
Pfam		VDlysifqldgignpsayv.y...GFees.kaccGyGgr.yNyn.rv.CGnag.l.ck.vtakaC	
Srim1	220	GDVNT-----TFAgHElCSGAPwL.HS.VT-----	242
Scoe1	153	LDLWLSRSVQDRRA-----	166
Scoe2	155	VDLYGAQSLADPRM-----	168
Ahyd1	225	AEMLRDPQNFGLSDQRNACyGgyvwwKPFASrSASTDSQLSaFNPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAA	291
Asa11	225	AEMLRDPQNFGLSDVENPCyDggyvwwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR	291
Ahyd2	237	AEMLRDPQNFGLSDVENPCyDggyvwwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASEPMAR	303
		▼	
Pfam		.dassyll.atl1fwDgf.HpsekGykavAeal<-*	
Srim1	243	-----LPVENSyHPTANGQSKGYLPV	263
Scoe1	167	-----WDADRL.HLSPegHTRVALRA	186
Scoe2	169	-----WDVDRL.HLTAEGHRRVAEAV	188
Ahyd1	292	rSASTLNCeGKMFWQDV.HPTTVVHAALSEPA	322
Asa11	292	rSASPLNCeGKMFWQDV.HPTTVVHAALSER	322
Ahyd2	304	rSASPLNCeGKMFWQDV.HPTTVVHAALSER	334

Figura 35

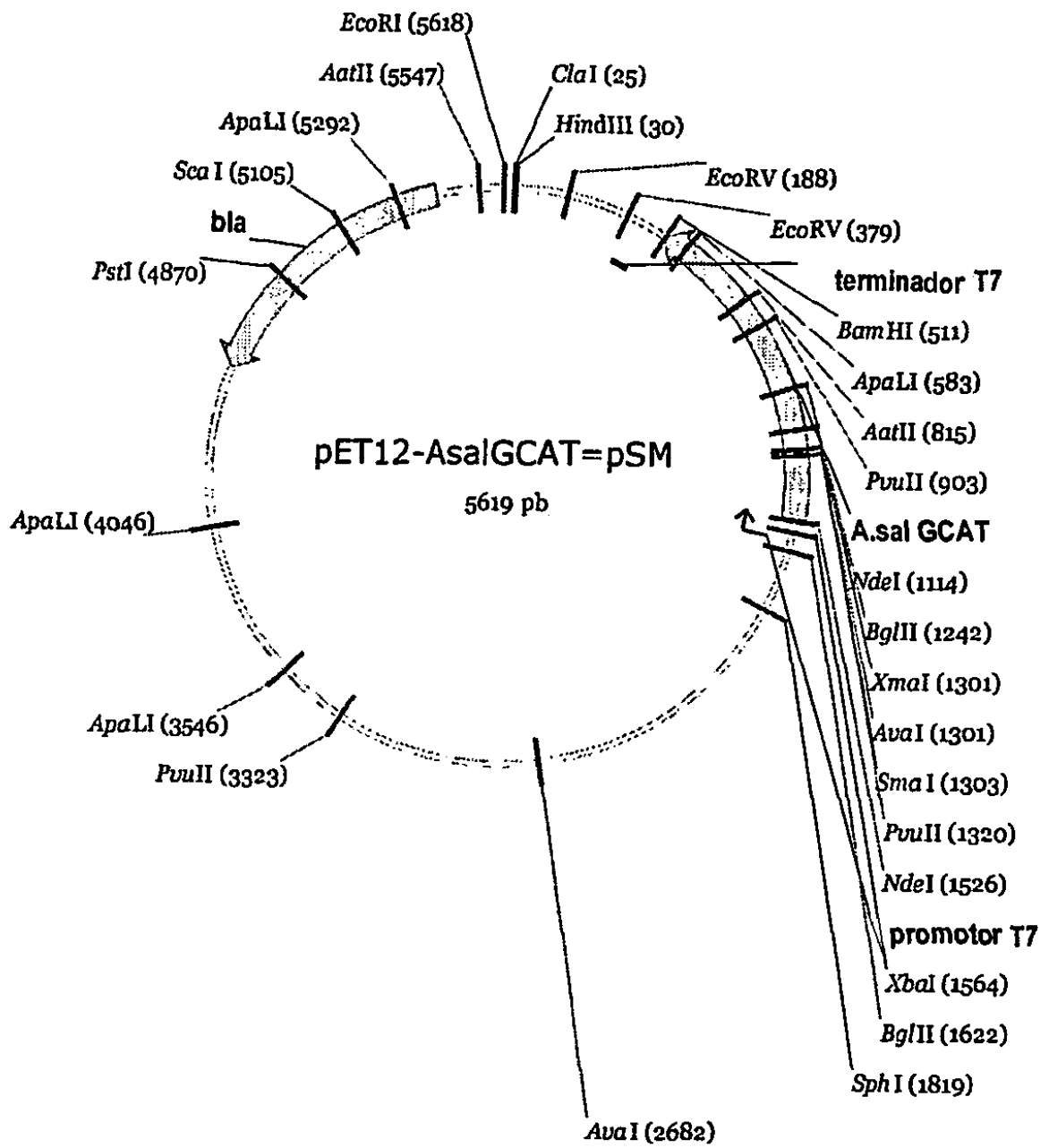


Figura 36

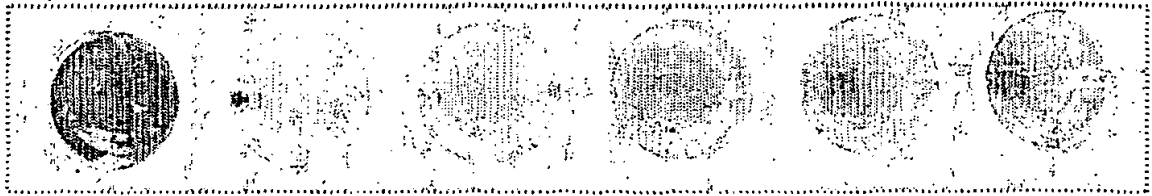


Figura 37

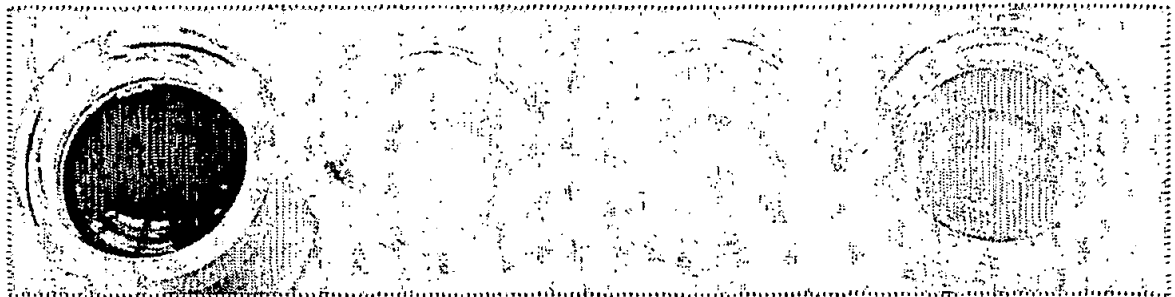


Figura 38

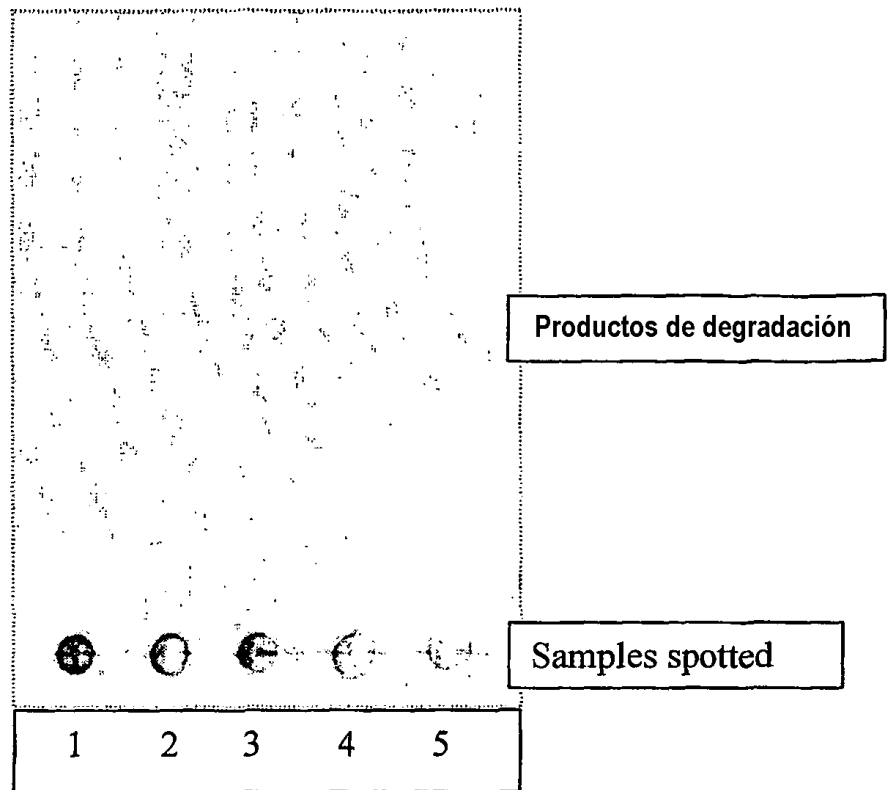


Figura 39

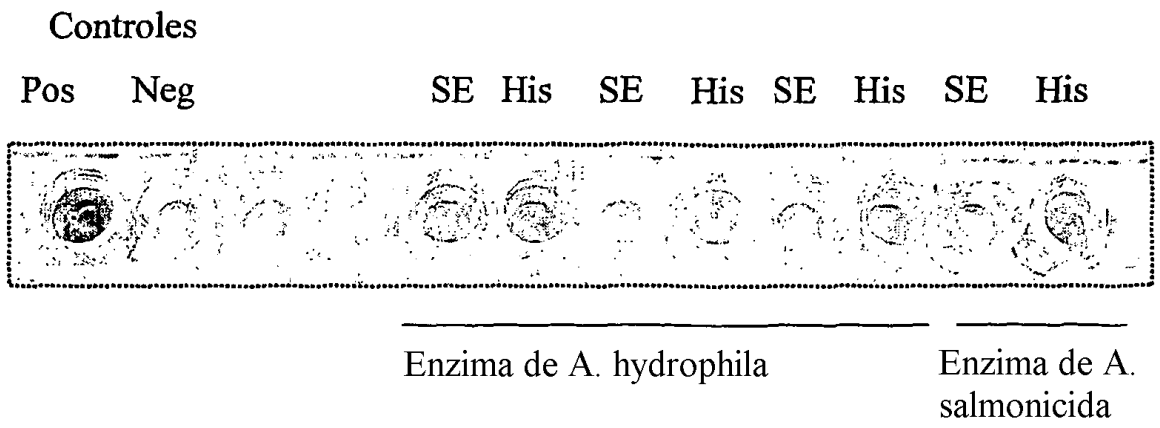


Figura 40

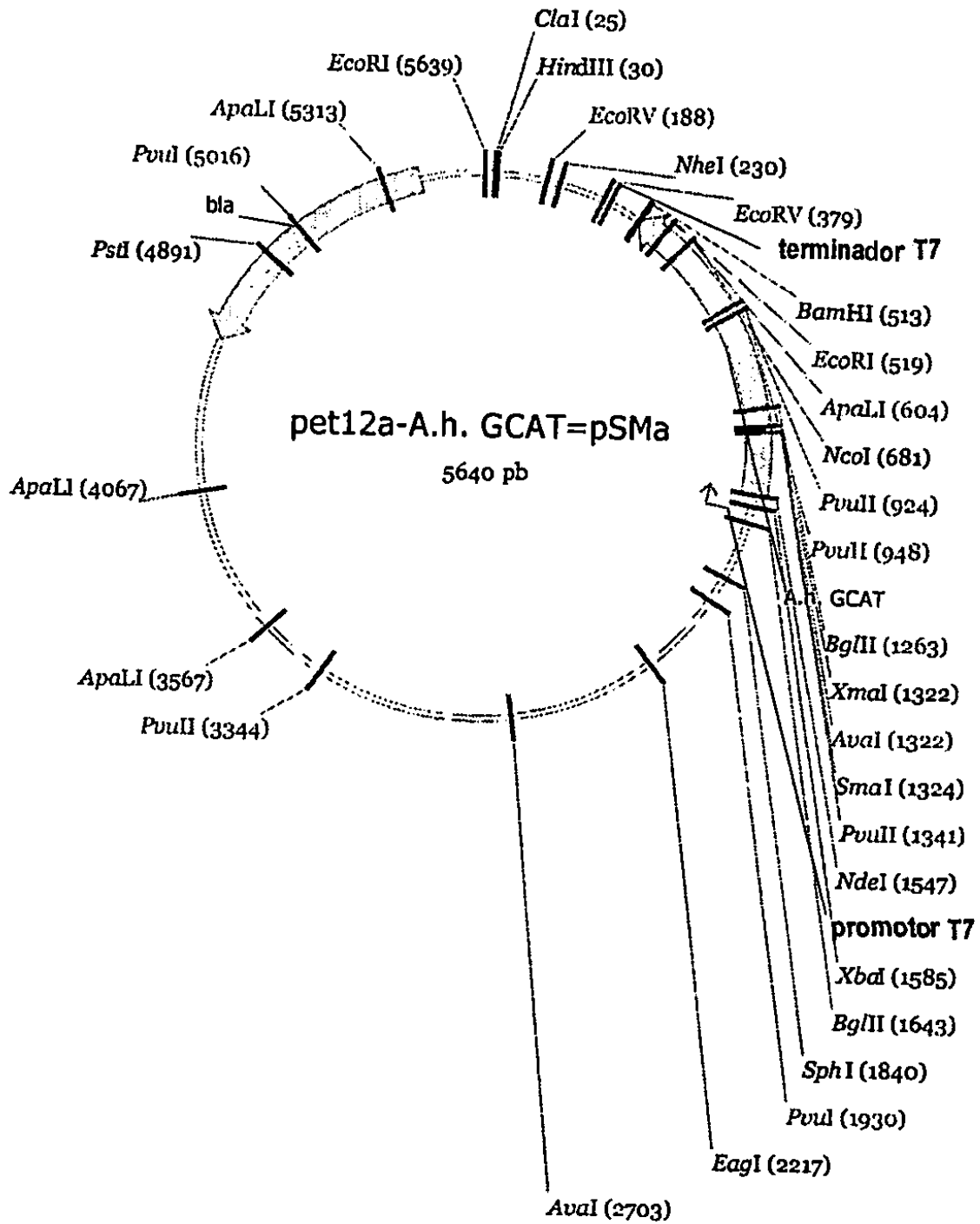


Figura 41:

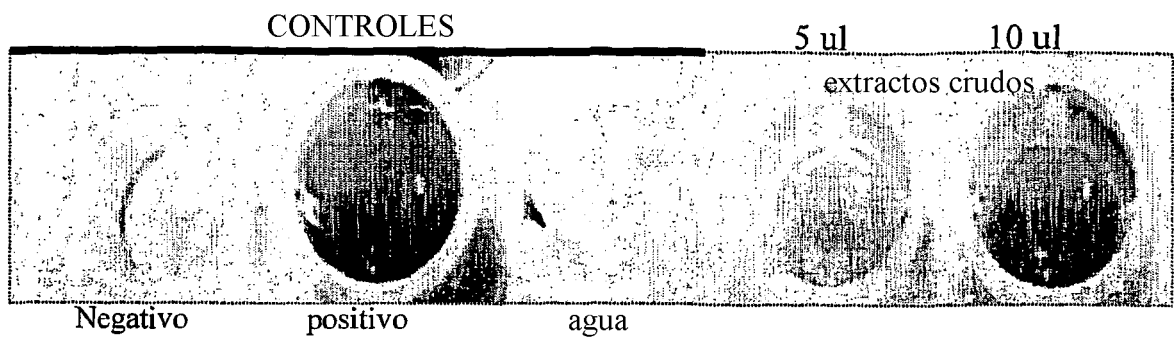


Figura 42

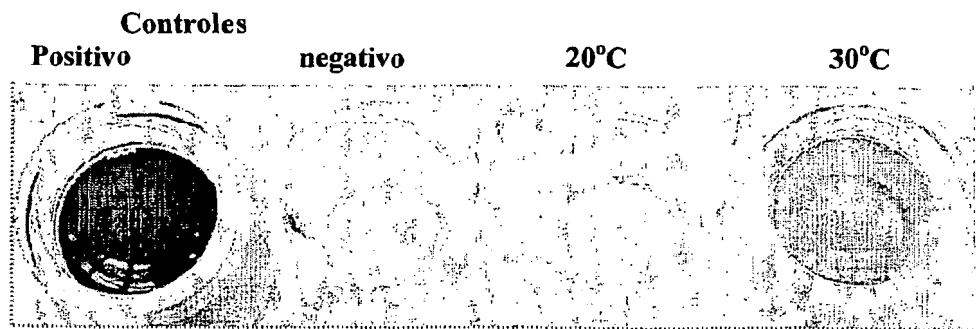


Figura 43

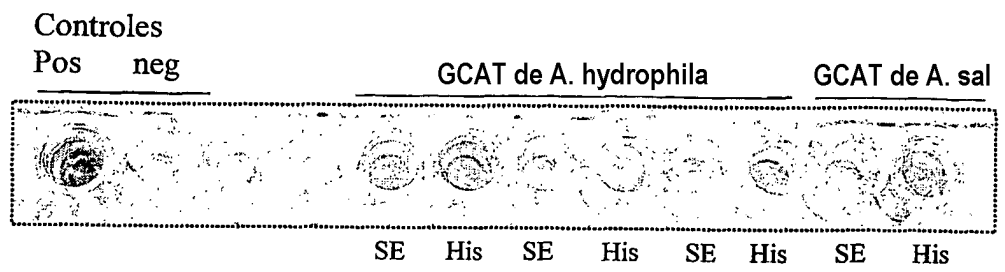


Figura 44

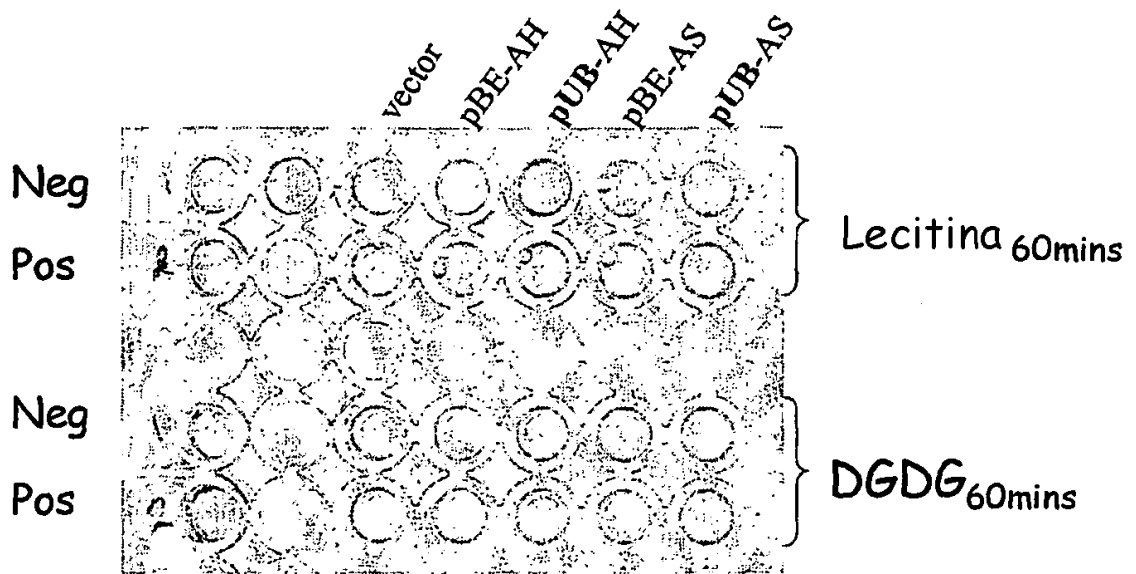


Figura 45

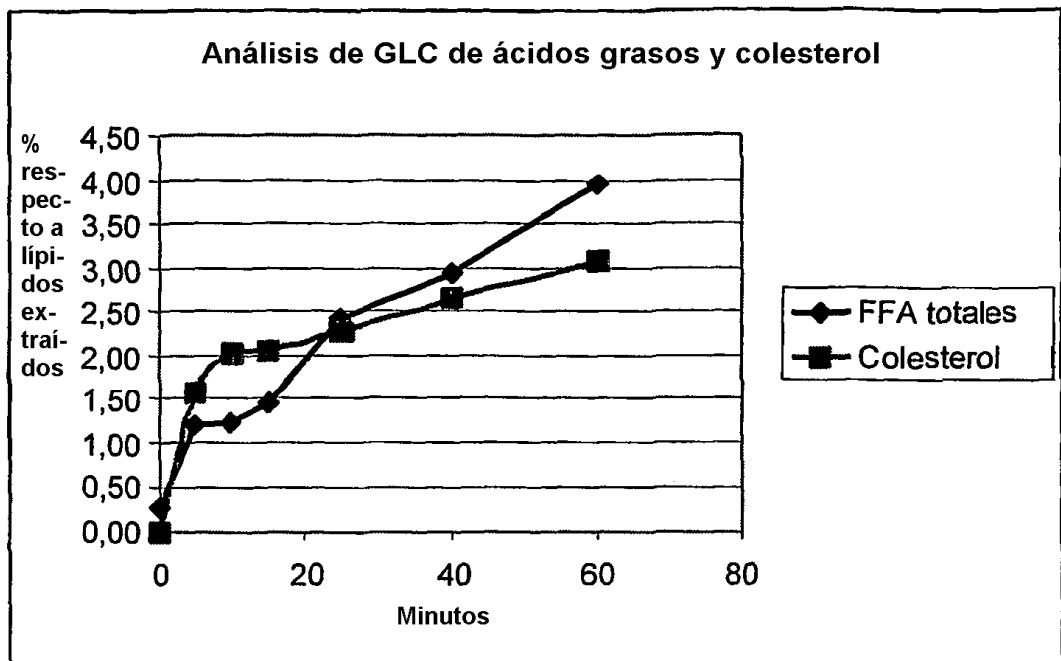


Figura 46

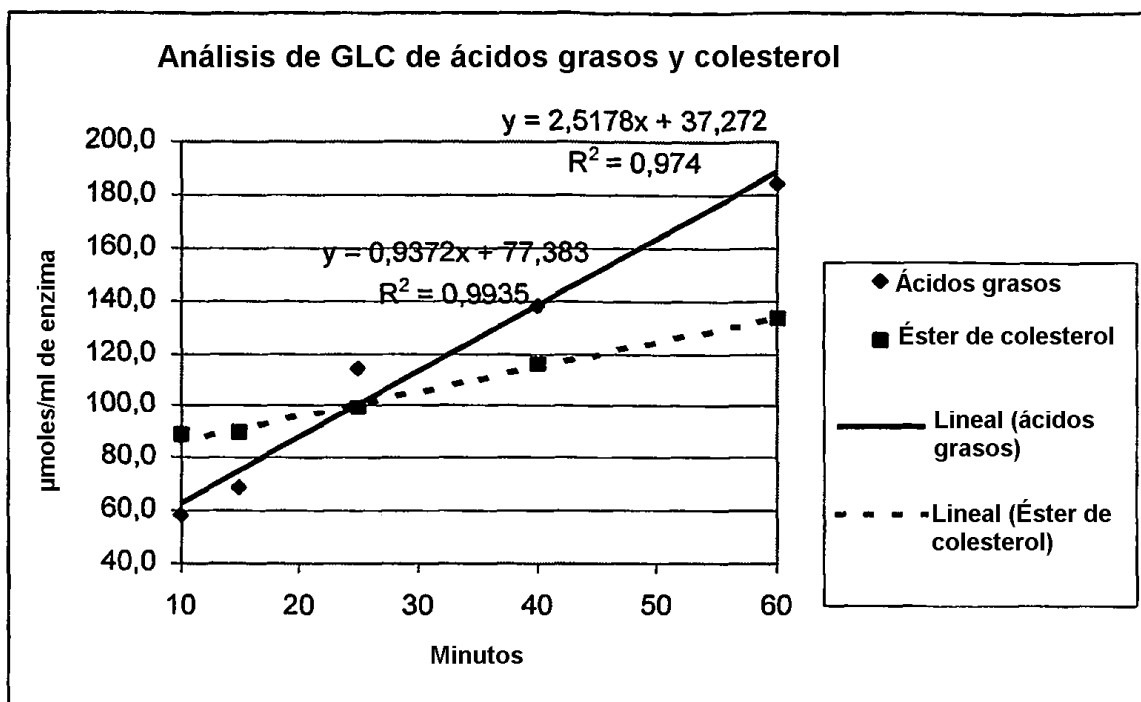


Figura 47

(SEC ID n° 36)

```
1  MFKFKKNFLV  GLSAALMSIS  LFSATASAAS  ADSRPAFSRI  VMFGDSLSDT
51  GKMYSKMRGY  LPSSPPYYEG  RFSNGPVWLE  QLTQFPGLT  IANEAEGGAT
101 AVAYNKISWN  PKYQVINNLD  YEVTQFLQKD  SFKPDDLVL  WVGANDYLAY
151 GWNTEQDAKR  VRDAISDAAN  RMVLNGAKQI  LLENLPDLGQ  NPSARSQKVV
201 EAVSHVSAYH  NQLLLNLARQ  LAPTGMVKLF  EIDKQFAEML  RDPQNFGLSD
251 VENPCYDGGY  VWKPFATRSV  STDRQLSAFS  PQERLAIAGN  PLLAQAVASP
301 MARRSASPLN  CEGKMFWDQV  HPTTVVHAAL  SERAATFIAN  QYEFLAH**
```

Figura 48 (SEC ID nº 54)

1 ATGTTTAAGT TTAAAAAGAA TTCCTTAGTT GGATTATCGG CAGCTTTAAT
 TACAAATCA AATTTTTCTT AAAGAATCAA CCTAATAGCC GTCGAAATTA
 51 GAGTATTAGC TTGTTTTTCGG CAACCGCCTC TGCAGCTAGC GCCGACAGCC
 CTCATAATCG AACAAAAGCC GTTGGCGGAG ACGTCGATCG CGGCTGTCGG
 101 GTCCCGCCTT TTCCCGGATC GTGATGTTTCG GCGACAGCCT CTCCGATACC
 CAGGGCGGAA AAGGGCCTAG CACTACAAGC CGCTGTCGGA GAGGCTATGG
 151 GGCAAAATGT ACAGCAAGAT GCGCGGTTAC CTCCTTCCA GCCCGCCCTA
 CCGTTTTACA TGTCGTTCTA CGCGCCAATG GAGGGGAGGT CGGGCGGGAT
 201 CTATGAGGGC CGTTTCTCCA ACGGACCCGT CTGGCTGGAG CAGCTGACCA
 GATACTCCCG GCAAAGAGGT TGCCTGGGCA GACCGACCTC GTCGACTGGT
 251 AACAGTTCCC GGGTCTGACC ATCGCCAACG AAGCGGAAGG CGGTGCCACT
 TTGTCAAGGG CCCAGACTGG TAGCGGTTGC TTCGCCTTCC GCCACGGTGA
 301 GCCGTGGCTT ACAACAAGAT CTCCTGGAAT CCAAGTATC AGGTCATCAA
 CGGCACCGAA TGTTGTTCTA GAGGACCTTA GGGTTCATAG TCCAGTAGTT
 351 CAACCTGGAC TACGAGGTCA CCCAGTTCTT GCAGAAAGAC AGCTTCAAGC
 GTTGGACCTG ATGCTCCAGT GGGTCAAGAA CGTCTTTCTG TCGAAGTTTCG
 401 CGGACGATCT GGTGATCCTC TGGGTCGGTG CCAATGACTA TCTGGCCTAT
 GCCTGCTAGA CCACTAGGAG ACCCAGCCAC GGTACTGAT AGACCGGATA
 451 GGCTGGAACA CGGAGCAGGA TGCCAAGCGG GTTCGCGATG CCATCAGCGA
 CCGACCTTGT GCCTCGTCTT ACGGTTTCGCC CAAGCGCTAC GGTAGTTCGT
 501 TGCGGCCAAC CGCATGGTAC TGAACGGTGC CAAGCAGATA CTGCTGTTC
 ACGCCGGTTG GCGTACCATG ACTTGCCACG GTTCGTCTAT GACGACAAGT
 551 ACCTGCCGGA TCTGGGCCAG AACCCGTCAG CTCGCAGTCA GAAGTGGTC
 TGGACGGCCT AGACCCGTC TTGGGCAGTC GAGCGTCAGT CTCCACCAG
 601 GAGGCGGTCA GCCATGTCTC CGCCTATCAC AACGAGTGC TGCTGAACCT
 CTCCGCCAGT CGGTACAGAG GCGGATAGTG TTGGTTCGACG ACGACTTGG
 651 GGCACGCCAG CTGGCCCCA CCGGCATGGT AAAGCTGTTT GAGATCGACA
 CCGTGGGTC GACCGGGGT GGCCGTACCA TTTCGACAAG CTCTAGCTGT
 701 AGCAATTTGC CGAGATGCTG CGTGATCCGC AGAACTTCGG CCTGAGCGAC
 TCGTTAAACG GCTCTACGAC GCACTAGGCG TCTTGAAGCC GCACTCGCTG
 751 GTCGAGAACC CCTGCTACGA CGGCGGCTAT GTGTGGAAGC CGTTTGCCAC
 CAGCTCTTGG GGACGATGCT GCCGCCGATA CACACCTTCG GCAAACGGTG
 801 CCGCAGCGTC AGCACCGACC GCCAGCTCTC CGCCTTCACT CCGCAGGAAC
 GCGTTCGAG TCGTGGCTGG CCGTCGAGAG GCGGAAGTCA GCGTCTCTG
 851 GCCTCGCCAT CGCCGGCAAC CCGCTGCTGG CACAGGCCGT TGCCAGTCTT
 CGGAGCGGTA GCGGCCGTTG GGCGACGACC GTGTCCGGCA ACGGTCAGGA
 901 ATGGCCCCGC GCAGCGCCAG CCCCTCAAC TGTGAGGGCA AGATGTTCTG
 TACCGGGCGG CGTCGCGGTC GGGGGAGTTG AACTCCCGT TCTACAAGAC
 951 GGATCAGGTA CACCCGACCA CTGTCGTGCA CGCAGCCCTG AGCGAGCGCG
 CCTAGTCCAT GTGGGCTGGT GACAGCACGT GCGTCGGGAC TCGTCCGCG
 1001 CCGCCACCTT CATCGCGAAC CAGTACGAGT TCCTCGCCCA CTGATGA
 GCGGCTGGAA GTAGCGCTG GTCATGCTCA AGGAGCGGGT GACTACT

Figura 49

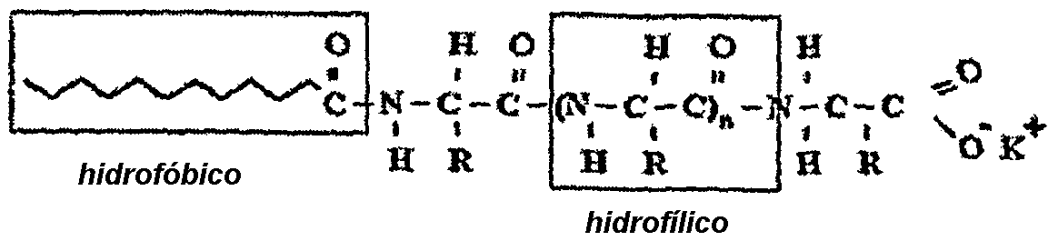


Figura 50

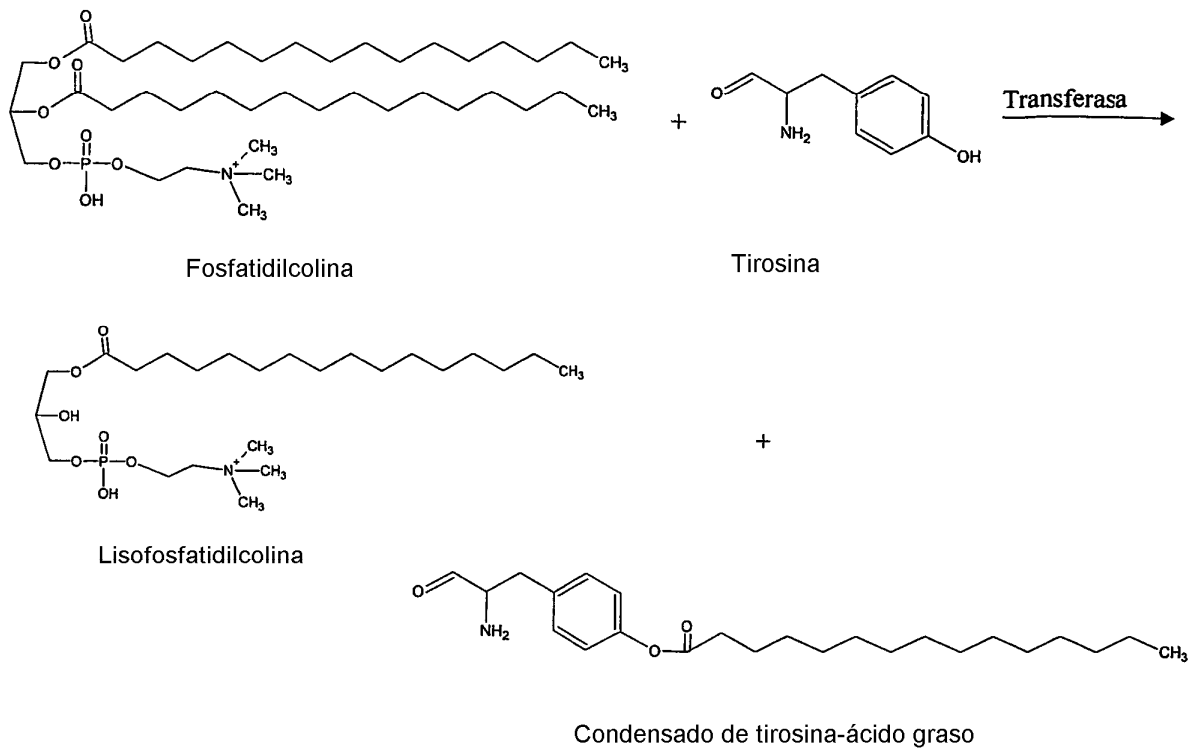


Figura 51

