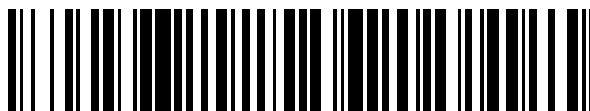


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 522**

51 Int. Cl.:

C12N 9/40 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A23L 1/09 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2006 E 06820587 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1974028**

54 Título: **alfa-Galactosidasa de Bifidobacterium bifidum y su uso**

30 Prioridad:

20.12.2005 GB 0525857

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

23.08.2013

73 Titular/es:

**CLASADO INC.
EDIFICIO INTERSECO, PISO 2 CALLE ELVIRA
MENDEZ APARTADO 0816-10560
PANAMA, PA**

72 Inventor/es:

**TZORTZIS, GEORGIOS;
GOULAS, ATHANASIOS, K. y
GOULAS, THEODOROS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 420 522 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

alfa-Galactosidasa de *Bifidobacterium bifidum* y su uso

La presente invención se refiere a una α -galactosidasa novedosa con actividad transgalactosilante capaz de convertir melibiosa en disacáridos de α -galactobiosa. En particular, se refiere a una α -galactosidasa aislada de una cepa descubierta recientemente de *Bifidobacterium bifidum*.

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

Las bifidobacterias colonizan de forma natural el tracto intestinal inferior, un entorno que es pobre en monosacáridos y disacáridos, puesto que dichos azúcares se consumen preferentemente por el hospedador y los microbios presentes en el tracto intestinal superior. Para sobrevivir en el tracto intestinal inferior, las bifidobacterias producen diversas clases de exoglucosidasas y endoglucosidasas en formas unida a superficie y/o extracelular mediante las que pueden utilizar diversos carbohidratos.

Además de la actividad hidrolasa, algunas enzimas de bifidobacterias muestran actividad transferasa. Esta actividad de transglucosilación de glucosidasas se usa extensamente para la síntesis enzimática de diversos oligosacáridos que han probado actuar como factores promotores del crecimiento de bifidobacterias.

Es conocido que miembros de bifidobacterias producen enzimas β -galactosidasas que están implicadas en el metabolismo bacteriano de la lactosa. Moller, P.L. *et al* en *Appl & Environ. Microbiol.*, (2001), 62, (5), 2276-2283 describen el aislamiento y caracterización de tres genes de β -galactosidasa de una cepa de *Bifidobacterium bifidum*. Encontraron que las tres β -galactosidasas eran capaces de catalizar la formación de galactooligosacáridos β -ligados mediante transgalactosilación.

Es conocido que algunas especies de bifidobacterias, pero no *B. bifidum*, producen α -galactosidasas así como β -galactosidasas. Las α -galactosidasas pertenecen al grupo de las glucosilo hidrolasas y pueden clasificarse en dos grupos basándose en su especificidad de sustrato, concretamente, un grupo es específico de sacáridos pequeños tales como p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido, melibiosa y rafinosa, y el otro grupo puede liberar galactosa de galactomananos tales como goma guar, además de sustratos pequeños.

"Secuencia aminoacídica de ORF de *Bifidobacteria longum* NCC2705 de SEQ ID No. 919" de la base de datos Geneseq [Online] de 19 de noviembre de 2002, XP002431983, recuperada del n° de acceso a EBI GSP: ABP66175, n° de acceso a la base de datos ABP 66175, da a conocer una secuencia aminoacídica de *B. longum*.

"Alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22)" de la base de datos UniProt [Online] de 1 de noviembre de 1999, XP002431984 recuperada del n° de acceso a EBI UNIPROT: Q9XCX2, n° de acceso a la base de datos Q9XCX2 y van den Broek L.A.M. *et al* en *Biotechnology Letters*, 21(5), (1999) 441-445, dan a conocer una secuencia de α -galactosidasa de *Bifidobacterium adolescentis*.

"Glucósido hidrolasa, clon GH-D" de la base de datos UniProt [Online] de 27 de septiembre de 2005, XP002431985 recuperada del n° de acceso a EBI UNIPROT: Q40Z83, n° de acceso a la base de datos Q40Z83, da a conocer una secuencia de glucósido hidrolasa.

Scalabrini P. *et al* en *J. Food Microbiology*, 39(3), (1998), 213-219 describen el análisis en cepas de *Bifidobacterium* de su actividad α -galactosidasa y de la producción de ácidos láctico y acético para determinar su potencial para uso en la producción de leche de soja fermentada.

Van Laere V.M.J. *et al* en *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), (1999), 681-688 describen una α -galactosidasa de *Bifidobacterium adolescentis*.

Lamoureux L *et al* en *J. Dairy Science*, 85(5), (2002), 1058-1069 describen la producción de oligosacáridos en yogur que contiene bifidobacterias y cultivos de yogur.

Se ha encontrado que una cepa de *Bifidobacterium bifidum* es capaz de producir una actividad de enzima galactosidasa que convierte la lactosa en una mezcla novedosa de galactooligosacáridos que contiene inesperadamente un 35% de disacáridos que incluyen galabiosa (Gal (α 1-6)-Gal). Este disacárido es conocido (véanse Paton, J.C. y Paton, A.W. (1998), *Clin. Microbiol. Revs.*, 11, 450-479; Carlsson, K.A. (1989), *Ann. Reviews Biochem.*, 58, 309-350) por ser un antiadhesivo capaz de evitar la adhesión de toxinas, por ejemplo toxina Shiga y patógenos tales como *E. coli*, a la pared del intestino.

Esta cepa de *B. bifidum* se depositó con el número de acceso NCIMB 41171 en la National Collection of Industrial & Marine Bacteria, Aberdeen, RU el 31 de marzo de 2003. Se describe también en la patente de RU n° 2.412.380.

Se ha encontrado que esta cepa de *B. bifidum* produce una α -galactosidasa que es capaz de convertir melibiosa en disacáridos de α -galactobiosa.

Según la invención, se proporciona una secuencia de ADN que codifica una proteína con una secuencia aminoacídica como se da en la in SEQ. ID NO: 2. La secuencia de ADN se da en SEQ. ID NO: 1.

- 5 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una enzima codificada por una secuencia de ADN como se define anteriormente. Dicha enzima puede comprender la secuencia aminoacídica dada en SEQ. ID NO: 2.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector recombinante, preferiblemente un vector de expresión, que comprende una secuencia de ADN como se define anteriormente. Dicho vector puede incorporarse a una célula hospedadora tal como una célula bacteriana, de levadura o fúngica. Como alternativa, la secuencia de ADN puede incorporarse a dicha célula hospedadora. Puede seleccionarse una célula hospedadora adecuada de *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* o *Bacillus*, por ejemplo *Bacillus subtilis* o *Bacillus circulans*, *Escherichia* y *Aspergillus*, por ejemplo *Aspergillus niger*.

Usando melibiosa como sustrato, la enzima codificada por la secuencia de ADN como se define anteriormente produce una mezcla de oligosacáridos, en particular disacáridos de α -galactobiosa.

- 15 La enzima o la célula hospedadora como se describe anteriormente pueden usarse para producir disacáridos de α -galactobiosa, que pueden formar parte de un producto para mejorar la salud intestinal. Dicho producto puede seleccionarse del grupo consistente en productos lácteos (por ejemplo, leche líquida, leche desecada en polvo tal como leche entera en polvo, leche desnatada en polvo, leche en polvo enriquecida con grasas, suero en polvo, leche para lactantes, leche de continuación, helado, yogur, queso y productos lácteos fermentados), bebidas tales como zumo de fruta, alimentos infantiles, cereales, pan, galletas, repostería, pasteles, suplementos alimentarios, suplementos dietéticos, productos comestibles prebióticos, productos comestibles prebióticos, piensos animales, piensos para aves o incluso cualquier otro alimento o bebida.

20 Como alternativa, los disacáridos así producidos pueden usarse para la preparación de un medicamento, por ejemplo en forma de comprimido o cápsula, para evitar la adhesión de patógenos o toxinas producidas por patógenos a la pared intestinal. El medicamento puede administrarse a un paciente, por ejemplo, después de un ciclo de tratamiento antibiótico, que a menudo altera o incluso destruye la flora intestinal sana normal.

25 Según un aspecto adicional más de la invención, se proporciona un proceso para producir una enzima como se define anteriormente que comprende cultivar una célula hospedadora como se define anteriormente en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permitan la expresión de la enzima y la recuperación de la enzima o productos enzimáticos resultantes del cultivo.

La invención está también dirigida a un proceso para producir disacáridos de galactobiosa que comprende poner en contacto la enzima como se define anteriormente o una célula hospedadora como se define anteriormente con un material que contiene melibiosa en condiciones que conduzcan a la formación de los disacáridos.

35 El material que contiene melibiosa adecuado puede seleccionarse de melibiosa, rafinosa, estaquirosa comercialmente disponibles o como un extracto de soja.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia nucleotídica (SEQ. ID NO: 1) de α -galactosidasa de *Bifidobacterium bifidum* con el codón de inicio y terminación indicados en letra en negrita;

40 la Figura 2 muestra la secuencia nucleotídica de la Figura 1 con la secuencia aminoacídica (SEQ. ID NO: 2) de la enzima;

la Figura 3 muestra los 540 primeros aminoácidos de la secuencia aminoacídica (SEQ. ID NO: 2) de la Figura 2;

la Figura 4 es una gráfica que muestra el curso temporal de la reacción durante la síntesis de α -galactooligosacáridos con α -galactosidasa y 40% (p/p) de melibiosa en tampón fosfato 0,1 M a pH 6,0 como sustrato; y

45 la Figura 5 muestra un cromatograma de intercambio aniónico de alta resolución de la mezcla de α -galactooligosacáridos sintetizada por α -galactosidasa a partir de *B. bifidum* NCIMB 41171 usando 40% (p/p) de melibiosa en tampón fosfato 0,1 M a pH 6,0 como sustrato. (Glc = glucosa, Gal = galactosa, Mel = melibiosa, DP = grado de polimerización). Las flechas de puntos designan los productos de galactooligosacáridos.

50 Se aisló ADN genómico de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) usando el método de Lawson *et al.* (1989) *Fems. Microbiol. Letters*, 65, (1-2), 41-45. Se digirió el ADN con enzimas de restricción y se ligaron los fragmentos que tenían un tamaño máximo de 15 kpb con el vector pBluescript KS(+). Se transformaron células de *E. coli* con un vector que contenía inserciones consistentes en ADN cromosómico digerido con PstI de *B. bifidum*. Se seleccionaron clones con actividad α -galactosidasa en placas de agar Luria Bertani que contenían p-nitrofenil- α -D-

galactopiranosido e isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). Se identificaron dos clones positivos de α -galactosidasa (pMeIA1 y pMeIA2).

5 Se digirieron los dos clones positivos con EcoRI, PstI y Bam HI y mostraron un patrón de restricción similar, indicando que ambos contenían el mismo fragmento de ADN insertado. Se efectuó la secuenciación de ADN del fragmento de ADN insertado MeIA1 usando el método de terminación de cadena con dideoxi de Sanger (Russel P., 2002 "iGenetics", Pearson Education, Inc., San Francisco, 187-189) usando el kit de secuenciación cíclica BigDye Terminator V.3.0 (Applied Biosystems, EE.UU.). La secuencia de ADN de MeIA1 se muestra en la Figura 1 (SEQ. ID NO: 1).

10 Se localizó el marco abierto de lectura (ORF) usando el buscador de ORF de la NCBI (National Center of Biotechnology Information). Se usó el código genético bacteriano y se determinó que la longitud del marco era de 300 pb. Se trajo la secuencia nucleotídica de la Figura 1 en todos los 6 posibles marcos de lectura y se identificó un marco abierto de lectura de 759 aminoácidos que codificaba una presunta α -galactosidasa. Se muestra la traducción en la Figura 2 (SEQ. ID NO: 2).

La presente invención se describirá adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos.

15 Ejemplos 1

Materiales y métodos

Todos los productos químicos y preparaciones de medios usados a lo largo de este estudio se obtuvieron de Sigma (Dorset, RU), Invitrogen (Paisley, RU), Oxoid (Basingstoke, RU), Qiagen (West Sussex, RU) y Promega (Southampton, RU).

20 Cepas bacterianas

La cepa *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) se mantuvo en perlas criogénicas en tubos Microbank a -70°C. Para los experimentos posteriores, se revivió la cepa en agar Wilkinson Chalgren (WC) (Oxoid, RU) y medio TPY (medio de tripticasa-fitona-extracto de levadura) y se cultivó anaeróbicamente (CO₂ y N₂ a 80 y 20% de composición, respectivamente) a 37°C durante 48 horas. Se ensayaron la morfología de las colonias y la ausencia de contaminación por tinción de Gram.

25 Cepas de *E. coli*

Se incubaron comúnmente las cepas de *Escherichia coli* RA11r y DH5a usadas en este estudio en condiciones aeróbicas a 37°C en agar o caldo Luria Bertani (LB) (Sambrook J. y Russell, W.D., (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York) y, cuando fue necesario, se suplementaron con antibióticos (ampicilina 100 μ g/ml y/o cloranfenicol 15 μ g/ml) y 40 μ l de X- α -galactopiranosido al 2% (X- α -Gal) y 7 μ l de (isopropil- β -D-tiogalactósido) IPTG al 20%, que se aplicaron sobre la superficie de una placa de agar de 90 mm prefabricada.

30 La cepa deficiente en α -galactosidasa *E. coli* RA11r (Hanatani *et al.*, 1983, *J. Biol. Chem.*, 259, (3), 1807-1812) (genotipo: *meIA*⁻, *recA*⁻, *lacZ*⁻) es un derivado de *E. coli* K12 y se usó en experimentos de expresión. La cepa *E. coli* DH5a (Invitrogen, Paisley, RU) (genotipo: F ϕ 80*lacZ* Δ M Δ (*lacZYA*-argF)U169 *recA1* *endA1* *hsdR17*(*rk*⁻, *mk*⁻) *phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* λ) es una cepa positiva de α -galactosidasa y se usó para todas las demás manipulaciones genéticas.

40 La elección de la cepa de *E. coli* RA11r para experimentos de expresión se realizó según su genotipo. Esta cepa no codifica una α -galactosidasa activa debido a la mutación de *meIA* en su ADN cromosómico. Sin embargo, esta cepa tiene un transportador de melibiosa activo que es necesario para el transporte de azúcares (melibiosa) al citoplasma y por tanto para el metabolismo de los mismos por α -galactosidasas activas. No se sabía si la α -galactosidasa de *Bifidobacterium bifidum* se expresaba intracelular o extracelularmente. Así, la existencia de un transportador de melibiosa activo era esencial para la identificación de los clones positivos de α -gal y por tanto el aislamiento de genes que codifican α -galactosidasa.

45 Además, esta cepa es un mutante de *recA* que minimiza la recombinación de ADN introducido con ADN hospedador, aumentando por tanto la estabilidad de los insertos.

Extracción de ADN genómico de *Bifidobacterium bifidum*

Se aisló ADN genómico de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) usando el método de Lawson *et al.* (1989).

50 Según este método, se recogieron las células de las placas en 0,5 ml de tampón TES en viales Eppendorf de 1,5 ml. Se añadieron 10 μ l de mezcla de lisozima/mutanolisina (4:1, lisozima 10 mg/ml; mutanolisina 1 mg/ml) y se mezcló entonces la mezcla y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se trataron entonces las células con 10 μ l de proteinasa K (a 20 mg/ml) y 10 μ l de ARNasa (10 mg/ml), se mezclaron y se incubaron durante 1 hora a 65°C. Después de la

incubación, se añadieron 100 µl de SDS al 10%, se mezclaron suavemente los lisados celulares mediante inversión y se incubaron durante otros 15 minutos a 65°C, seguido de la adición de 0,62 ml de fenol/cloroformo y se mezclaron mediante inversión hasta que se formó una emulsión. Se centrifugó el lisado celular a 6.500 rpm durante 10 minutos

5 Se transfirió la capa acuosa superior a un vial Eppendorf limpio usando una punta de pipeta azul de boca ancha. Se repitió la extracción (etapa de desproteización) hasta que se eliminó completamente el desecho celular. Se precipitó el ADN mediante la adición de 1 ml de etanol enfriado con hielo seguido de incubación durante al menos 30 minutos en hielo o se almacenó durante una noche en un congelador a -20°C. Se recuperó el ADN genómico mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos y, después de secar, se resuspendió en 50 µl de Tris-HCl 10 mM estéril a pH 8.

10 Se analizó el ADN extraído mediante electroforesis en gel y se midió la concentración a 260 nm. Se almacenó a -20 o -70°C durante periodos prolongados de tiempo y se evitó una descongelación-congelación múltiples para reducir la posibilidad de degradación.

Preparación de ADN de vector

15 El vector usado a lo largo de este estudio era pBluescript KS(+) (Stratagene, North Torrey Pines Road). Se eligió este vehículo de clonación debido a que el promotor *lac*, que pBluescript KS (+) codifica, es necesario para la iniciación de la transcripción de genes que carecen de su propio promotor.

20 Se digirió el vector con las siguientes enzimas de restricción: PstI, BamHI y EcoRI según las instrucciones del fabricante, usando un exceso de 10 veces de enzima frente a ADN (unidades enzimáticas: µg de ADN iguales a 10 unidades de enzima por 1 µg de ADN de plásmido o a 10 unidades enzimáticas por 0,5 pmol de ADN de plásmido). Después de inactivación térmica de la enzima (20 min a 65°C), se analizaron los patrones de restricción mediante análisis de electroforesis en gel horizontal.

25 Se desfosforilaron adicionalmente los vectores con fosfatasa alcalina intestinal de ternero CIAP (Promega, Southampton, RU) según las instrucciones del fabricante. Se ensayó la eficacia del tratamiento mediante el autoligamiento del vector (con ADN ligasa del bacteriófago T4 según las instrucciones del fabricante) después de transformación en células DH5a.

La presencia de un solo fragmento en el gel indicaba la digestión completa del vector y su única digestión de restricción. Se ensayó también la digestión suficiente del vector transformando moléculas no ligadas en células *E. coli* DH5a competentes. El número de colonias formadas en placas de agar LB suplementadas con ampicilina (100 µg/ml) era un indicador de las moléculas no digeridas y del fondo esperado durante los experimentos posteriores.

30 Construcción de una colección de ADN genómico

35 Se digirió parcialmente ADN genómico con tres enzimas de restricción que reconocen secuencias hexanucleotídicas de aparición frecuente en ADN procariótico. EcoRI, BamHI y PstI son endonucleasas de restricción de tipo II que reconocen específicamente las secuencias 5'G/AATTC'3, 5'G/GATCC'3 y 5'CTGCA/G'3, respectivamente, y causan roturas de la cadena doble en estas secuencias, generando salientes en 5' de 4 nucleótidos, AATT, GATC para EcoRI y BamHI, respectivamente, y salientes en 3', ACGT para PstI.

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

Digestión de restricción de ADN

40 Se incubaron todas las digestiones de restricción de las muestras de ADN genómico durante 2 horas a 37°C y finalmente se inactivaron térmicamente a 65°C durante 20 minutos. Se enfriaron entonces las reacciones a temperatura ambiente y se añadió la cantidad apropiada de tampón de carga, seguido de una suave agitación con un capilar de vidrio sellado. Se cargaron entonces las disoluciones en pocillos de gel de agarosa al 0,8% (alimentación de 4-5 V/cm durante 14-16 horas) y se estimó el tamaño del ADN digerido con el de patrones de ADN de 1 kpb (Promega, RU) (Sambrook J. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2002)).

45 Purificación de los fragmentos generados después de digestión de restricción

Se realizó la purificación de fragmentos de las mezclas de reacción y los geles de agarosa usando el kit de extracción de gel QIAEX de Qiagen (West Sussex, RU). Los protocolos se describen con detalle en el manual del fabricante.

Ligamiento y transformación de ADN

50 Después de la purificación de los fragmentos de ADN con el kit de extracción de gel Qiaex, se ligaron con vector pBluescript KS (+) tratado con CIAP. Para el ligamiento, se transfirieron cantidades apropiadas de ADN a tubos de microcentrífuga estéril de 0,5 ml como se muestra en la Tabla 1.

Tubo ADN

- A Vector (15 fmoles [~29,7 ng])
- B Vector (15 fmoles ~29,7 ng de ADN) más inserto extraño (15 fmoles ~69,3 ng)
- C pUC de control (0,056 fmoles [~100 pg])

La relación molar del vector de ADN de plásmido a fragmento de ADN de inserto debería ser de ~1:1 en la reacción de ligamiento. La concentración de ADN final debería ser de ~10 ng/μl.

- 5 **Tabla 1:** Mezclas de ligamiento. El tubo A muestra el número de ADN de vector autoligados, que debe restarse del número total de transformantes después de la transformación. El tubo B muestra el ligamiento del vector con los fragmentos de ADN y el tubo C muestra el control para calcular la eficacia de transformación.

10 Antes de cada ligamiento, se calentaron los fragmentos de ADN a 45°C durante 5 minutos para fundir cualquier extremo cohesivo que se reasociara durante la preparación de fragmentos. Se eligió una relación molar de vector:inserto de ADN de 1:1 para todas las reacciones de ligamiento y se realizó el montaje de la reacción según las instrucciones de Promega.

15 Se añadieron 1,0 μl de tampón de ligamiento 10x y 0,5 unidades Weiss de ADN ligasa T4 (Promega, RU) a los tubos A y B, y se ajustó el volumen de ligamiento a 10 μl con agua de pureza para biología molecular. Se añadió 1,0 μl de tampón de ligamiento 10x a los tubos C y se ajustó el volumen de ligamiento a 10 μl con agua de pureza para biología molecular.

Se añadieron fragmentos de ADN a los tubos junto con el agua y se calentaron entonces a 45°C durante 5 minutos, para fundir cualquier extremo cohesivo que se reasociara durante la preparación. Se enfrió el ADN a 0°C antes de añadir el resto de los reactivos de ligamiento y se incubaron las mezclas de reacción durante una noche a 16°C (Sambrook y Russell, 2001).

- 20 Después de la precipitación con etanol y la purificación de los fragmentos ligados (para eliminar la mezcla de ligamiento que puede causar una reducción de la eficacia de transformación), se efectuaron transformaciones según las instrucciones de Hanahan. Se añadieron ~50 ng de ADN ligado en 5 μl de disolución a 100 μl de células *E. coli* RA11r competentes. Después del tratamiento térmico y la expresión del gen de resistencia a ampicilina, se distribuyeron las células por la superficie de placas LB que contenían ampicilina (100 μg/ml), X-α-Gal (40 μl de X-α-Gal al 2%) e IPTG (7 μl de IPTG al 20%).
- 25

Se midió el número de transformantes para cada reacción de ligamiento. El número de transformantes obtenido comúnmente del tubo C era de 2×10^5 - 1×10^6 ufc/μg, mientras que del tubo A era de 500-600 ufc/μg. El número de transformantes en el tubo A era una indicación de la eficacia de tratamiento del ADN de vector. El número de transformantes en el tubo B estaba en el intervalo de $2-4 \times 10^4$ ufc/μg.

30 Número de transformantes

Las mezclas de ligamiento con ADN cromosómico con PstI daban lugar a dos clones positivos de α-galactosidasa (pMeIA1 y pMeIA2) de aproximadamente 2500 transformantes examinados, mientras que el ADN cromosómico tratado con EcoRI y BamHI no daba ningún clon positivo de aproximadamente 4000 transformantes examinados totales.

35 Digestión de clon positivo

40 Se digirieron los dos clones positivos de PstI con las enzimas de restricción EcoRI, PstI, BamHI, HindIII, SmaI y KpnI. Las enzimas de restricción EcoRI, PstI y BamHI mostraron un patrón de restricción similar, un fragmento de ~5 kpb (gen de interés) y otro de ~3 kpb (ADN de plásmido), indicando que estas enzimas cortaban en las mismas posiciones. HindIII daba un fragmento de 6,5 kpb y un fragmento de 1,5 kpb, mientras que las enzimas SmaI y KpnI daban un fragmento de ~8 kpb de tamaño, indicando que cortaban en solo una posición. Los patrones de restricción similares para ambos plásmidos eran indicativos de que ambos contienen el mismo inserto de fragmento de ADN.

Secuenciación de ADN

45 Se efectuó la secuenciación de ADN con el método de terminación de cadena con didesoxi de Sanger usando el kit secuenciador cíclico BigDye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems, EE.UU.) y se analizó con ABI Prism 3100, un sistema de análisis de ADN basado en la fluorescencia que incorpora electroforesis capilar.

Se secuenciaron los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ADN insertados con cebadores específicos de vector. Se secuenciaron adicionalmente los insertos usando Genome Priming System (GPS-1) (New England Biolabs, RU). El GPS-1 es un sistema *in vitro* basado en el transposón TN7 que usa la transposasa TnsABC para insertar un transposón aleatoriamente en el ADN diana. Se usó una relación de masa de ADN donante:diana de 1:4 según las instrucciones del fabricante. El número de plásmidos aislados para secuenciar después de la inserción del Transprimer en el plásmido diana era de 25. El número se calculó según las instrucciones del fabricante y supone una amplitud de cobertura de 5 veces.

Los sitios de cebado únicos en ambos extremos del elemento Transprimer permitieron la secuenciación de ambas hebras del ADN diana en la posición de inserción.

La mezcla de reacción de secuenciación contenía aproximadamente 400-600 ng de ADN de plásmido, 3,2 pmol de disolución cebadora y 4 µl de disolución de BigDye Terminator.

Identificación del marco abierto de lectura

Se localizó el marco abierto de lectura (ORF) usando el buscador de ORF de NCBI. Se usó el código genético bacteriano y se determinó que la longitud del marco era de 300 pb. Se tradujo la secuencia nucleotídica en todos los 6 marcos posibles y se identificó un marco abierto de lectura de 759 aminoácidos que codifica una presunta α-galactosidasa (se muestra la traducción en la Figura 2). Se confirmaron el codón de inicio y terminación.

Se expresó el gen de α-galactosidasa de *Bifidobacterium* en el plásmido pMelA1 en *E. coli* en condiciones de crecimiento que normalmente reprimirían la expresión del promotor *lacZ* inducible de *E. coli* localizado en la región flanqueante del vector de clonación. Esta observación indicaba que las secuencias bifidobacterianas internas endógenas en dirección 5' del gen de α-galactosidasa pueden servir como señal de iniciación de la transcripción en *E. coli*.

Se indica el inicio de la transcripción en letras en negrita y cursiva. Los resultados anteriores indican que el gen se controla por su propio promotor de transcripción.

Ejemplo 2

Síntesis con la enzima clonada de α-galactosidasa aislada de *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 en el hospedador de *E. coli* (cepa RA11)

La siguiente síntesis descrita, a menos que se afirme otra cosa, se efectuó con las células hospedadoras de *E. coli* RA11 completas después del tratamiento de la biomasa de *E. coli* (recogida mediante centrifugación a 10.000 g) con tolueno a una concentración de 2000 ppm para aumentar la permeabilidad celular y para volver también las células inviables al destruir su membrana citoplasmática. Se preparó la biomasa de *E. coli* como se describe en el ejemplo 1 en "Cepas de *E. coli*".

Síntesis con la enzima clonada

Se efectuó la síntesis con α-galactosidasa a una concentración de sustrato de concentración inicial de melibiosa al 40% (p/p). Se preparó la disolución de síntesis en tampón fosfato 0,1 M a pH 6,0. Se efectuó la síntesis a 40°C en baño de agua agitado a 150 rpm. Se eligió el pH óptimo para la enzima específica basándose en las medidas de actividad (usando p-nitrofenil-α-D-galactopiranosido como sustrato) de una preparación enzimática específica a valores de pH variables.

Para la síntesis de α-galactosidasa, se centrifugaron 2 ml de una suspensión de células *E. coli* RA11 (con una actividad de 0,3 U/ml) (a 10.000 g) para recoger la biomasa y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió esta biomasa con 1 g de disolución de sustrato de melibiosa al 40% (p/p) para efectuar la síntesis.

Se muestran en la Figura 4 las concentraciones de los diferentes azúcares presentes en la mezcla durante la síntesis. Se muestran en la Figura 5 cromatogramas de cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada con detección amperimétrica por pulsos (HPAEC-PAD) de mezclas de galactooligosacáridos sintetizadas por la α-galactosidasa clonada de *B. bifidum* NCIMB 41171. Se muestran en la tabla 1 las concentraciones de azúcares de la mezcla de galactooligosacáridos en el momento de síntesis óptimo.

Tabla 1. Composición de carbohidratos de una síntesis de α-galactooligosacáridos a una concentración de melibiosa inicial del 40% (p/p) en el momento en que se observaba la concentración máxima de oligosacárido.

Sustrato inicial de síntesis	GOS DP≥3	GOS DP=2	Mel	Glc	Gal
% (p/p)	Concentración (% de azúcares totales)				
40	13,93	6,61	38,06	24,1	17,29

Mel: Melibiosa, Glc: glucosa, Gal: galactosa, DP: grado de polimerización

Listado De Secuencias

- <110> Lindsay, Clare L
- 5 <120> Producto y proceso
- <130> P/13587.WO
- <150> GB 0525857.9
- 10 <151> 20-12-2005
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.4
- 15 <210> 1
- <211> 3129
- <212> ADN
- <213> *Bifidobacterium bifidum*
- 20 <220>
- <221> gen
- <222> (1)..(6)
- 25 <400> 1

```

taaaccttca taaaaggaaa caaaagctgg aagctccacc gcggtggcgg ccgctctaga      60
actagtggat cccccgggct gcagctcgtg gtgatctacg ttccgttcct caactccgcg      120
ttcggcacca cgccgctcgg accgtgggca tgggtcgagt gcatctgcct cgccgcggtc      180
gtactgatcg cctcggaaat ctacaaggcg atcatgcgcg ccatcgaccg caagcgcgggc      240
atcatggcat aacaatgcca taagcctcca ccggcagtca gggctcccgc tctccacatc      300
ggaaaacggg agcccttctc ataccccgga atcgctgaat atgcggtgac atgacggaac      360
gatgtcgtag catcggaggc gaaccatata tcaatggcac gttccgaagg gattcgcaat      420
gtcactcatc gaacaattcc atggcgccgc cgccgatgga acggaactca ccgctattta      480
tgctgagcag cgggctgctg atgtggcgtt cgcgctggtc ttcgccggtc acggtcttcc      540
gcgcttcgtg cactggggcc gaccgctcgc ggcgccggga accgtactcg ccgcatacga      600
cgccctgcgg ccgcagcgcg tgtccggcgc gctggacgag accgcctggc caagcatcat      660
gcccacgcaa agcagagtcgt ggataggggc accgcgactg gatatccggc gcgccggcgt      720
aacgccgttc tgtgcattca cggtgaccgg catcgcaatc cgtcaggacg aacgccaagg      780
cgttgacgtg tctgacggcg tggacggtgc cggcatacc gtcacgcaac aggtgccggt      840
cgtcaccgtg accgcgtcgg atgccgagca gggcgtggaa ctgtcatgga cggccgaact      900
gttgcccggc ggactgatca gacagcgcac cacgctgcgt aatcttccag ccggtaatct      960
tccgaccggt gacttgaag tccgtaaagt cgaactcggc tcccgcctcc cggcacttgc     1020
cacggagata ctaccacca ccggccatca tctgcgcgaa cgagcccgc agcggcagcc     1080
gctgaccgaa ggacgcttcg agaaggcttc gatggcgggg cgccaggtt ttgacgcctc     1140
tctgttgctt tccgcgggcg agcccggctt cgggttcgag catggcgagg tctattcggg     1200
gcatgtgggc tggagcggca attccgtgct gtcggcagag cgtcagccgt atacgaccgg     1260
    
```


ES 2 420 522 T3

tctgattggc ggcggcgagg tgctgctcgg cggcgaggcc acgctcgccc gcggcgaaac 1320
gtacaccacc ccgtggctgt acgggtcgta cggtgacggg ctcaacgagg tggctgcgag 1380
attccatgat tacgtacgct cctgtcaccg ggatctcgcc gtcaagccgc gtccggtgat 1440
tctcaacacg tgggaggccg tgtatttcga ccatgactac gacacgttga aggctctggc 1500
cgataaggcc ggggattccg gtgtcgaacg gttcgtggtg gatgacggct ggttcggctc 1560
ccgccgagac tccacatccg ggctcggcga ctggcaaata gcgcaggatg tgtggccgga 1620
cgggccgaag agcctcaagg cgctcggcga ttacgtgcac ggaaaaggca tggagtccgg 1680
cctgtggttc gaaccggaga tggtaaaccc ggattccgac gtggcccggc cccaccctga 1740
ctgggtgctg cgcccgactg cgaaccgtct gccgatgcag ggacgctcgc agcaagtgtc 1800
cgacctgacc aatcccgcag cctaccgata catccatgat tccatcgatg cgctggctcg 1860
cgagttgggc atcgactaca tcaaatggga ccacaacaaa ttcgtcaccg aggcggtctc 1920
gccacgtacc ggcaggccgg cgggtcacgg gcagacgctc gccgtgtacc ggatgttccg 1980
tgacctgaa gtcgcatc cgggactgga gattgagagt tgcgcatcgg gcggcggccg 2040
tatcgacctg ggcatactcg aattcgccag ccgctgtgg acgtccgact gcgtggacct 2100
ggtcgagcgg gccgatattc agcggtacac gtcgctgctc gtgccgccct gcatgatggg 2160
cgagcatgtg ggggcgagtc ctgcacattc cacgcatcgc gccacgagcc aggagatgcg 2220
catggcgatg gcgttcttcg ggcacatggg cgtcgaatgg aatctgctca aggagccgga 2280
cgaggcgttg aacaagctcg gcgaatgggt cgccgaatac aagaggcacc gcgcatggtt 2340
cgcgatcgac acgtgctgac acgccgatat cgccgatccg gccgtccggg tcgacggcat 2400
ggtcaagccg gatcgttccg cggcgttcta ccggttcacg caactgacaa cgtcccagac 2460
tctccctgcg gcgccgattc gcgtgcccgg tcttgacccc gatggcacgt accgcataca 2520
gccgttggctg ctggatctcg atctcgacgg gcttggctctt ggcagcggcc agtcgccggt 2580
gggctggtgg accaaagacg gcgtgctgat gacgggcccg gcgctgatga cctacggggt 2640
gcgccctcca tcgctgcatc cggcgcagtc ggtgctgttc accgccattc gccaataagc 2700
cagacggcat cgaacggagc ataacaatgt gccggcggcc cagtcatgga gtcgccggca 2760
cattgcgtca aagaacttgg gtatcggtc tagtcgttga cgtcggcctt gtagaagttc 2820
acgtaggaac ggctgggggt cgggccgcgc tggccctgat aatgggagcc ggtgcccttg 2880
gagccgtaag ggtgctcggc cggagagctg agctggaaga agcacatctg cccgatcttc 2940
atgccgggccc agagcttgac cggaaagcgc gacacgttgc tcaactccag cgtgatatgc 3000
ccctcgaaac cggggtcgat gaagccggcc gtcgaatgtg tgaggatgcc cagacggccc 3060
agcgagcttt tgccttccaa gcgtgccgcc accgtcgcgt cgagcttgac ggtactcccc 3120
acgtcgagc 3129

<210> 2
<211> 759
5 <212> PRT
<213> *Bifidobacterium bifidum*
<400> 2

ES 2 420 522 T3

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

ES 2 420 522 T3

Glu Val Tyr Ser Val His Val Gly Trp Ser Gly Asn Ser Val Leu Ser
 260 265 270
 Ala Glu Arg Gln Pro Tyr Thr Thr Gly Leu Ile Gly Gly Gly Glu Val
 275 280 285
 Leu Leu Gly Gly Glu Ala Thr Leu Ala Arg Gly Glu Thr Tyr Thr Thr
 290 295 300
 Pro Trp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Gly Leu Asn Glu Val Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg Phe His Asp Tyr Val Arg Ser Cys His Pro Asp Leu Ala Val Lys
 325 330 335
 Pro Arg Pro Val Ile Leu Asn Thr Trp Glu Ala Val Tyr Phe Asp His
 340 345 350
 Asp Tyr Asp Thr Leu Lys Ala Leu Ala Asp Lys Ala Gly Asp Ser Gly
 355 360 365
 Val Glu Arg Phe Val Val Asp Asp Gly Trp Phe Gly Ser Arg Arg Asp
 370 375 380
 Ser Thr Ser Gly Leu Gly Asp Trp Gln Ile Ala Gln Asp Val Trp Pro
 385 390 395 400
 Asp Gly Pro Lys Ser Leu Lys Ala Leu Ala Asp Tyr Val His Gly Lys
 405 410 415
 Gly Met Glu Phe Gly Leu Trp Phe Glu Pro Glu Met Val Asn Pro Asp
 420 425 430
 Ser Asp Val Ala Arg Ala His Pro Asp Trp Val Leu Arg Pro Thr Ala
 435 440 445
 Asn Arg Leu Pro Met Gln Gly Arg Ser Gln Gln Val Leu Asp Leu Thr
 450 455 460
 Asn Pro Asp Ala Tyr Arg Tyr Ile His Asp Ser Ile Asp Ala Leu Val
 465 470 475 480
 Gly Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Ile Lys Trp Asp His Asn Lys Phe Val
 485 490 495
 Thr Glu Ala Val Ser Pro Arg Thr Gly Arg Pro Ala Val His Gly Gln
 500 505 510
 Thr Leu Ala Val Tyr Arg Met Phe Arg Asp Leu Glu Val Ala His Pro
 515 520 525

ES 2 420 522 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ADN que codifica una proteína con una secuencia aminoacídica como se da en SEQ. ID. NO: 2.
- 5 2. La secuencia de ADN según la reivindicación 1, en la que la secuencia se da en SEQ. ID NO: 1.
3. Una enzima codificada por una secuencia de ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Una enzima que comprende una secuencia aminoacídica según SEQ. ID NO: 2.
5. Una α -galactosidasa que tiene la secuencia definida en SEQ. ID NO: 2.
6. Un vector recombinante que comprende una secuencia de ADN de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
- 10 7. El vector según la reivindicación 6, en el que dicho vector es un vector de expresión.
8. Una célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
9. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 6 o la reivindicación 7.
10. La célula hospedadora según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en la que dicha célula es una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula fúngica.
- 15 11. La célula hospedadora según la reivindicación 10, en la que dicha célula se selecciona del grupo consistente en *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Bacillus* y *Aspergillus*.
12. La célula hospedadora según la reivindicación 11, en la que la célula se selecciona del grupo consistente en *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans* y *Aspergillus niger*.
- 20 13. Uso de una enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o de una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para producir disacáridos de α -galactobiosa.
14. Uso de una enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o de una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para producir disacáridos de α -galactobiosa que son parte de un producto seleccionado del grupo consistente en productos lácteos tales como leche líquida, leche desecada en polvo, leche para lactantes, leche de continuación, helado, yogur, queso, productos lácteos fermentados, bebidas tales como zumo de fruta, alimentos infantiles, cereales, pan, galletas, repostería, pasteles, suplementos alimentarios, suplementos dietéticos, productos comestibles prebióticos, productos comestibles prebióticos, piensos animales, piensos para aves y medicamentos.
- 25 15. Uso de una célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para producir un producto seleccionado del grupo consistente en productos lácteos tales como leche líquida, leche desecada en polvo, leche para lactantes, leche de continuación, helado, yogur, queso, productos lácteos fermentados, bebidas tales como zumo de fruta, alimentos infantiles, cereales, pan, galletas, repostería, pasteles, suplementos alimentarios, suplementos dietéticos, productos comestibles prebióticos, productos comestibles prebióticos, piensos animales, piensos para aves y medicamentos.
- 30 16. Un proceso para producir una enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende cultivar una célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permitan la expresión de dicha enzima y recuperar la enzima resultante del cultivo.
- 35 17. Un proceso para producir un disacárido que comprende poner en contacto una enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o una célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, con una solución de melibiosa.

40

Figura 1.

```

1 taaaccttca taaaaggaaa caaaagctgg aagctccacc gcggtggcgg ccgctctaga
61 actagtggat cccccgggct gcagctcgtg gtgatctacg ttccgttcct caactccgcg
121 ttcggcacca cgccgctcgg accgtgggca tgggtcgagt gcactctgct cgccgcggtc
181 gtactgatcg cctcggaaat ctacaaggcg atcatgcgcg ccatcgaccg caagcgcggc
241 atcatggcat aacaatgcca taagcctcca ccggcagtcg gggctcccgc tctccacatc
301 ggaaaacggg agcccttctc ataccccgga atcgtgaaat atgctggtag atgacggaac
361 gatgtcgtag catcggaggc gaaccatata tcaatggcac gttccgaagg gattcgcaat
421 gtcactcatc gaacaattcc atggcgccgc cgccgatgga acggaactca ccgctattta
481 tgctgagcag ccggctgctg atgtggcggt cgcgctggtc ttccgcggtc acggtcttcc
541 gcgcttcgtg cactggggcc gaccgctcgc ggcgccggga accgtactcg ccgcatacga
601 gcgcttcggt ccgcagcgcg tgcgcccgcg gctggacgag accgcctggc caagcatcat
661 gccacgcaa agcagtcgtt ggataggggc accgcgactg gatatccggc gcgcccggcg
721 aacgcccgtt tgtgcattca cggtagccgg catcgcaatc cgtcaggacg aacgccaagg
781 cgttgacgtg tctgacggcg tggacggctg cgcgcatacc gtcacgcaac aggttccggt
841 cgtcacgctg accgctcggg atgcccagca gggcgtggaa ctgtcatgga cggccgaact
901 gttgcccggc ggactgatca gacagcgcac cacgctcgtt aatcttccag ccgtaatct
961 tccgaccggt gacttgaag tcggtaaagt cgaactcggc ttcccgtccc cggcacttgc
1021 cacggagata ctcaccacca ccggccatca tctgcgcgaa cgagcccgcg agcggcagcc
1081 gctgaccgaa ggacgcttcg agaaggtctc gatggcgggg cgcccaggtt ttgacgcctc
1141 tctgttgctt tccgcccggc agcccggctt cgggttcgag catggcgagg tctattcggg
1201 gcatgtgggc tggagcggca attccgtgct gtccgagag cgtcagccgt ataccgcccg
1261 tctgattggc ggcggcgagg tgctgctcgg cggcgaggcc acgctcgcgc gcggcgaaac
1321 gtacaccacc ccgtggctgt acgggtcgtg cggtagcggg ctcaacgagg tggctgcgag
1381 attccatgat tacgtacgct cctgtcaccg ggcctcgcgc gtcaagccgc gtccgggtgat
1441 tctcaacacg tgggaggccg tgtatttcca ccatgactac gacacgttga aggctctggc
1501 cgataaggcc ggggattccg gtgtcgaacg gttcgtggtg gatgacggct ggttccgctc
1561 ccgcccagac tccacatccg ggctcggcga ctggcaaata gcgcaggatg tgtggccgga
1621 cgggcccgaag agcctcaagg gcctcgcgca ttacgtgcac ggaaaaggca tggagtccgg
1681 cctgtgggtc gaaccggaga tggtaacccc ggattccgac gtggcccgcg cccaccctga
1741 ctgggtgctg cgcgactg cgaaccgtct gccgatgcag ggacgctcgc agcaagtgtc
1801 cgacctgacc aatcccagcg cctaccgata catccatgat tccatcgatg ccgtggctcg
1861 cgagttgggc atcgactaca tcaaatggga ccacaacaaa ttcgtcaccg aggcgggtctc
1921 gccacgtacc ggacggccgg cggtagcagg gcagacgctc gccgtgtacc ggtgttccg
1981 tgacctgaa gtccgcacac cgggactgga gattgagagt tgcgcatcgg tgcgcccggc
2041 tctcgacctg ggcatactcg aattcgccag ccggtgtggt acgtccgact gcgtggacc
2101 ggtcgagcgg gccgatattc agcggtagac gtcgctgctc gtgcccctt gcgatggg
2161 cgagcatgtg gggcgagtc ctgcacattc cacgcatcgc gccacgagcc aggagatgcg
2221 catggcgatg gcgttcttcg ggcacatggg cgtcgaatgg aatctgctca aggagccgga
2281 cgagggcgtg aacaagctcg gcgaatgggt cgccgaatac aagaggcacc gcgcatgggt
2341 cgcgatcgac acgtgctgac agcccgatat cgccgatccg gccgtccggy tgcacggcat
2401 ggtcaagccg gatcgttccg cggcgttcta ccggttcacg caactgacaa cgtcccagac
2461 tctccctgcg gcgcccattc gcgtgcccgg tcttgacccc gatggcacgt accgcataca
2521 gccgttgtgg ctggatctcg atctcgacgg gcttggcttt ggcagcggcc agtcgcccgtt
2581 gggctggtgg accaaagacg gcgtgctgat gacgggcccg gcgctgatga cctacgggtt
2641 gcgcccctca tcgctgcac cggcgcagtc ggtgctgttc accgccattc gccaaatagg
2701 cagacggcat cgaacggagc ataacaatgt gccggcggcc cagtcatgga gtcgcccgca
2761 cattgctca aagaacttgg gtatcggtc tagtcggtga cgtcggcctt gtagaagttc
2821 acgtaggaac ggctgggggt cggcgcgcgc tggccctgat aatgggagcc ggtgcccttg
2881 gagccgtaag ggtgctcggc cggagagctg agctggaaga agcacatctg cccgatcttc
2941 atgcccggcc agagcttgac cggagcgtc gacacgttgc tcaactccag cgtgatatgc
3001 ccctcgaaac cgggtcgat gaagccggcc gtcgaatgtg tgaggatgcc cagacggccc
3061 agcgagcttt tgccttccaa gcgtgcccgc accgtcgcgt cgagcttgac ggtactcccc
3121 acgtcgagc

```

Figura 2.

421 atgtcactcatcgaacaattccatggcgccgcccgatggaacg
 M S L I E Q F H G A A A D G T
 466 gaactcaccgctatattatgctgagcagccggctgctgatgtggcg
 E L T A I Y A E Q P A A D V A
 511 ttcgcgctgggtcttcgcccgtcacggcttccgcgcttcgctgcac
 F A L V F A G H G L P R F V H
 556 tggggccgaccgctcgccggcgggaaccgtactcgccgcatac
 W G R P L A A P G T V L A A Y
 601 gacgccctgcccgcagcgcgtgtccggcgcgctggacgagacc
 D A L R P Q R V S G A L D E T
 646 gcctggccaagcatcatgccacgcaaagcagctcgtggatggg
 A W P S I M P T Q S E S W I G
 691 gcaccgcgactggatatccggcgcgcccggcgtaacgcgcttctgt
 A P R L D I R R A G V T P F C
 736 gcattcacggtgaccggcatcgcaatccgtcaggacgaacgcaa
 A F T V T G I A I R Q D E R Q
 781 ggcggtgacgtgtctgacggcgtggacgggtgccgcgcataccgtc
 G V D V S D G V D G A A H T V
 826 acgcaacaggtgccggctcgtcacccgtgaccgcgctcggatgccgag
 T Q Q V P V V T V T A S D A E
 871 cagggcgtggaactgtcatggacggccgaactggtgccggcggcga
 Q G V E L S W T A E L L P G G
 916 ctgatcagacagcgcaccacgctgcgtaatcttccagccggtaat
 L I R Q R T T L R N L P A G N
 961 cttccgaccgggtgacttggaaagtcggtaaagtcgaactcggcttc
 L P T G D L E V G K V E L G F
 1006 ccgctcccggcacttggccacggagatactcaccaccaccggccat
 P L P A L A T E I L T T T G H
 1051 catctgcgcgaacgcagcccgcagcggcagccgctgaccgaagga
 H L R E R S P Q R Q P L T E G
 1096 cgcttcgagaaggtctcgaatggcggggcgcccaggttttgacgcc
 R F E K V S M A G R P G F D A
 1141 tctctgttgccttccgcccggcagcccggcttcgggttcgagcat
 S L L L S A G E P G F G F E H
 1186 ggcgaggtctattccggtgcatgtgggctggagcggcaattccgtg
 G E V Y S V H V G W S G N S V
 1231 ctgtcggcagagcgtcagccgtatacagccggtctgattggcggc
 L S A E R Q P Y T T G L I G G
 1276 ggcgaggtgctgctcggcggcggagccacgctcgcgccgcccggcga
 G E V L L G G E A T L A R G E
 1321 acgtacaccaccccgtggctgtacgggtcgtacgggtgacgggctc
 T Y T T P W L Y G S Y G D G L
 1366 aacgaggtggctgcgagattccatgattacgtacgctcctgtcac
 N E V A A R F H D Y V R S C H
 1411 ccggatctcgcgctcaagccgcgctccgggtgattctcaacacgtgg
 P D L A V K P R P V I L N T W
 1456 gaggccgtgtatttcgaccatgactacgacacggtgaaggctctg
 E A V Y F D H D Y D T L K A L
 1501 gccgataaggccggggattccgggtgtcgaacgggttcgtgggtgat
 A D K A G D S G V E R F V V D
 1546 gacggctgggttcggctcccggcggagactccacatccgggctcggc
 D G W F G S R R D S T S G L G
 1591 gactggcaaatagcgcaggatgtgtggccggacgggcccgaagagc

D W Q I A Q D V W P D G P K S
 1636 ctcaaggcgctcgccgattacgtgcacggaaaaggcatggagttc
 L K A L A D Y V H G K G M E F
 1681 ggctgtggttcgaaccggagatgggtcaaccggattccgacgtg
 G L W F E P E M V N P D S D V
 1726 gcccgcgcccaccctgactgggtgctgcgcccgactgcaaccgt
 A R A H P D W V L R P T A N R
 1771 ctgccgatgcagggacgctcgcagcaagtgctcgacctgaccaat
 L P M Q G R S Q Q V L D L T N
 1816 cccgacgcctaccgatacatccatgattccatcgatgcgctggtc
 P D A Y R Y I H D S I D A L V
 1861 ggcgagttgggcatcgactacatcaaattgggaccacaacaattc
 G E L G I D Y I K W D H N K F
 1906 gtcaccgagggcgtctcgccacgtaccggcagggccggcggtgcac
 V T E A V S P R T G R P A V H
 1951 gggcagacgctcgcgctgtaccggatggtccgctgacctcgaagtc
 G Q T L A V Y R M F R D L E V
 1996 gcgcatccgggactggagattgagagttgcgcatccggcggcggc
 A H P G L E I E S C A S G G G
 2041 cgtatcgacctgggcatactcgaattcgccagccgctgtggacg
 R I D L G I L E F A S R V W T
 2086 tccgactgcgtggaccggctcgagcgggcccgatattcagcggtac
 S D C V D P V E R A D I Q R Y
 2131 acgtcgtgctcgtgcccgcctgcatgatggggcagcatgtgggg
 T S L L V P P C M M G E H V G
 2176 gcgagtcctgcacattccacgcatcgccacagagccaggagatg
 A S P A H S T H R A T S Q E M
 2221 cgcattggcgatggcgcttcttcggggcacatggggcgtcgaatggaat
 R M A M A F F G H M G V E W N
 2266 ctgctcaaggagccggacgagggcgttgaacaagctcggcgaatgg
 L L K E P D E A L N K L G E W
 2311 gtcgccgaatacaagaggcaccgcgcatggttcgcgatcgacacg
 V A E Y K R H R A W F A I D T
 2356 tgcgtgcacgccgatatcgccgatccggccgctccgggtcgacggc
 C V H A D I A D P A V R V D G
 2401 atgggtcaagccggatcgttccgcgggcgttctaccggttcacgcaa
 M V K P D R S A A F Y R F T Q
 2446 ctgacaacgtcccagactctccctgcgggcgcogattcgcgtgcc
 L T T S Q T L P A A P I R V P
 2491 ggtcttgacccccgatggcacgtaccgcatacagccgttgtggctg
 G L D P D G T Y R I Q P L W L
 2536 gatctcgatctcgacgggcttgggtcttggcagcggccagtcgccg
 D L D L D G L G L G S G Q S P
 2581 ttgggctgggtggaccaagacggcgtgctgatgacggggccggggc
 L G W W T K D G V L M T G R A
 2626 ctgatgacctacgggttgcgccctccatcgctgcatccggcgcag
 L M T Y G L R P P S L H P A Q
 2671 tcggtgctggtcaccgccattcggccaataa 2700
 S V L F T A I R Q *

Figura 3.

MSLIEQFHGAAADGTELTAIYAEQPAADVAFALVFAGHGLPRFV
HWGRPLAAPGTVLAAYDALRPQRVSGALDETAWPSIMPTQSESWIGAPRLDIRRAGVTPFCAFTVTG
IAIRQDERQGVVDVSDGVDGAAHTVTQQVPVVTVTASDAEQVELSWTAELLPGGLIRQRTTLRNLP
AGNLPDLEVGKVELGFPLPALATEILTTTGHHLRERSPQRQPLTEGRFEKVSMAGRPGFDASLLS
AGEPGFGFEHGEVYSVHVGWSGNSVLSAERQPYTTGLIGGGEVLLGGEATLARGETYTPWLYGSY
GDGLNEVAARFHDYVRSCHPDLAVKPRPVILNTWEAVYFDHDYDTLKALADKAGDSGVERFVDD
GWFGSRRDSTSGLDWQIAQDVWPDGPKSLKALADYVHGKMEFGLWFEPEMVNPDSDVARAHP
DWVLRPTANRLPMQGRSQVLDLTPDAYRYIHDSIDALVGELGIDYIKWDHNKQVTEAVSPRTGR
PAVHGQTLAVYRMFRDLEVAHPGLEIESCASGGG

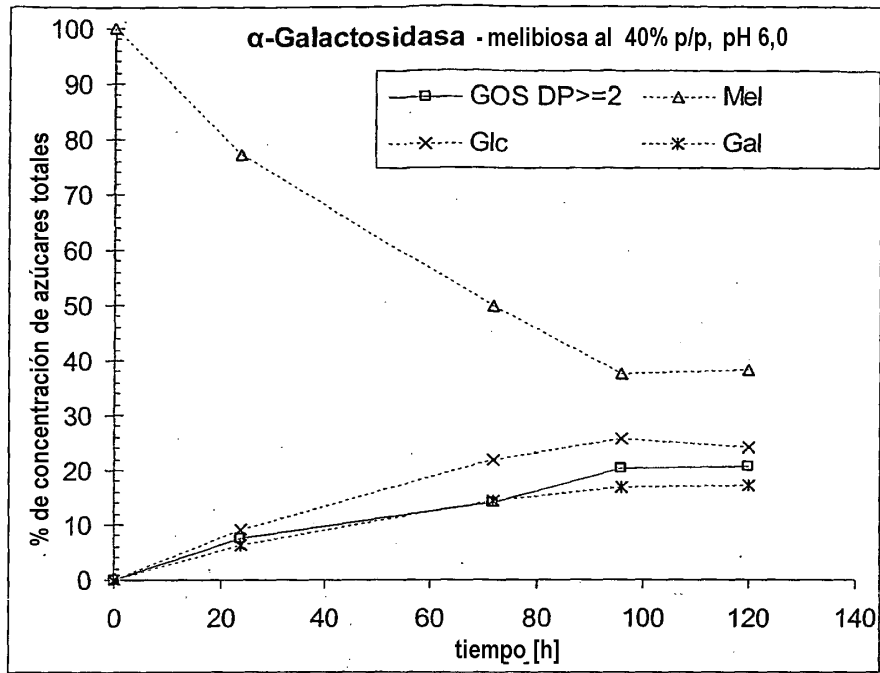


Figura 4

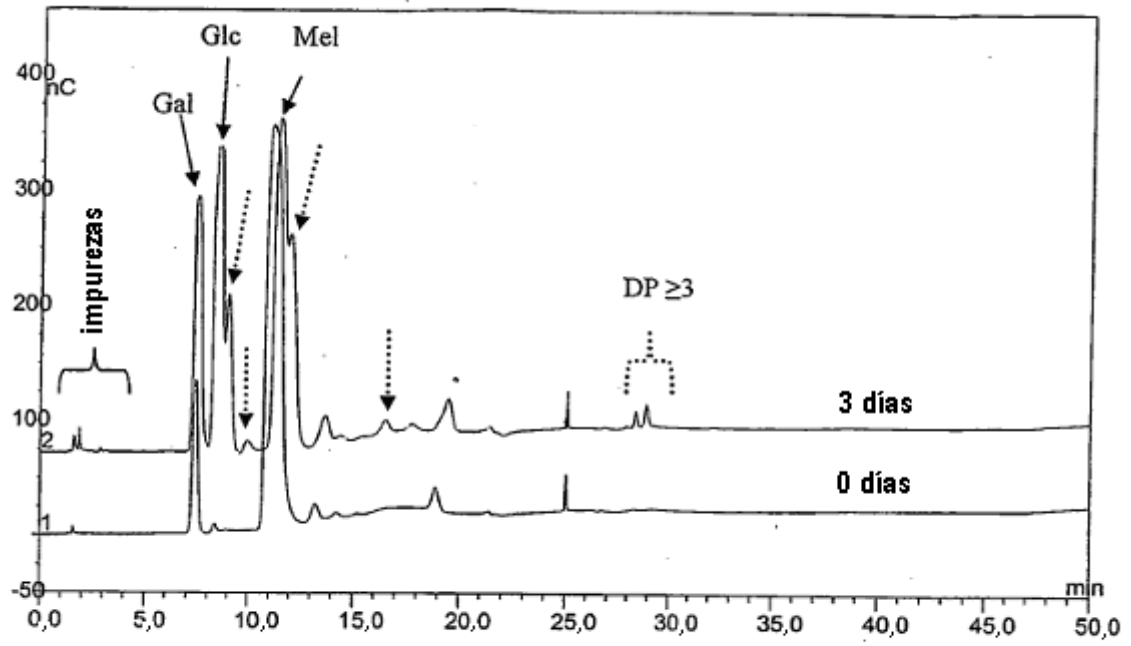


Figura 5