

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 527**

51 Int. Cl.:

A23L 1/212 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11721325 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2579731**

54 Título: **Alimento rehidratable**

30 Prioridad:

08.06.2010 EP 10165272

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

01.04.2014

73 Titular/es:

UNILEVER NV (100.0%)

Weena 455

3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es:

BERRY, MARK JOHN;

CASEY, JOHN;

GUNGABISSOON, RAVINE ANTHONY;

ORMEROD, ANDREW PAUL;

REDFERN, SALLY PAMELA;

SILVA DE, JACQUELINE y

WILKINSON, JOY ELIZABETH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 452 527 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

Alimento rehidratable

5 La presente invención se refiere a un alimento rehidratable seco, en particular a un alimento que es una fruta, verdura o una de sus partes. La presente invención también se refiere a procedimientos para su fabricación y a un producto alimenticio, tal como una sopa seca, una bebida seca, un cereal para desayuno, un yogur y una salsa seca, que comprende el alimento rehidratable seco anteriormente mencionado.

10 El uso de un alimento rehidratable seco, tal como una sopa seca, una bebida seca, un cereal para desayuno, un yogur y una salsa seca, está muy extendido. No obstante, se ha observado que cuando los componentes secos son fruta y/o verdura, los componentes, tras la rehidratación, no se parecen a la fruta y/o verdura antes del desecado. Es decir, no mantienen un aspecto fresco sino que se decoloran y pierden firmeza. Esta transformación se debe al daño celular que tiene lugar durante el desecado. En particular, se piensa que las membranas de fosfolípidos se desestabilizan por medio de inserción de anfífilos celulares, transición de fase en el interior de la fase de gel y fusión de membrana.

20 Serrano y col. (Food Sci. Tech. Int., 9(3), 157-161 (2003)) describen las aplicaciones potenciales para la deshidratación de alimentos y divulgan que se ha observado que las proteínas abundantes de embriogénesis tardías (LEA) abundan a niveles elevados durante el proceso de maduración de la embriogénesis de semillas y también en todos los tejidos de plantas que experimentan estrés hídrico. Las proteínas LEA comprenden, entre otras, las deshidrinas. Los autores afirman que las proteínas LEA pueden estabilizar proteínas y membranas durante el desecado por medio de un mecanismo similar a los osmolitos. Es decir, confiriendo la hidratación preferencial de las estructuras celulares, y posteriormente sustituyendo agua durante el desecado. Los osmolitos también contribuyen al ajuste osmótico y actúan como secuestrante eficaz de radicales hidroxilo durante el desecado. Los autores también divulgan que parece que tres sistemas biológicos actúan conjuntamente para lograr tolerancia frente al desecado: enzimas implicadas en la síntesis de osmolitos; proteínas especializadas en la protección frente al desecado de membranas y proteínas (proteínas LEA); y enzimas y moléculas antioxidantes.

30 DATABASE UniProt (2008-11-04), nº. de acceso a la base de datos B5TV66, divulga una proteína de deshidrina con una secuencia de amino ácidos 99,5 % idéntica a la SEQ. Nº. ID 1 y 98,8 % idéntica a la SEQ. Nº. ID 2.

35 El documento US 4 781 937 A divulga productos alimenticios deshidratados rehidratables nutricionales que contienen de aproximadamente 10 a 35 % de grasa y de aproximadamente 15 a 60 % en peso de proteína.

La presente invención busca solucionar el problema técnico anteriormente mencionado proporcionando, entre otros, un alimento rehidratable seco que es una fruta, verdura o una de sus partes que, tras la rehidratación, tiene propiedades mejoradas de aspecto, textura y rehidratación.

40 Sumario de la invención

45 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un alimento rehidratable seco, que comprende menos de un 10 % en peso/peso de agua y al menos un 0,02 % en peso/peso de proteína de deshidrina y sus derivados, comprendiendo las proteínas de deshidrina y sus derivados una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en K, I, K, E, K, L, P, G; K, I, K, E/D, K, L/I, P, G; y K, I, K, E/D, K, L/I/T/V, P/H/S/G, y en la que el alimento rehidratable seco es un tejido no roto de una verdura o una de sus partes y/o de una fruta o una de sus partes, y no una semilla, en la que el tejido no roto tiene la dimensión lineal más corta de al menos 0,5 milímetros, preferentemente una dimensión lineal más corta de 0,5 a 25, más preferentemente de 0,5 a 10 milímetros.

50 Por el término "rehidratable" se entiende que el alimento se puede rehidratar hasta al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, del modo más preferente al menos un 70 % en peso/peso del contenido de agua de una verdura completamente hidratada o una de sus partes y/o una fruta o una de sus partes. Preferentemente, el término "rehidratable" significa que el alimento se puede rehidratar hasta no más de un 99 %, preferentemente no más de un 97 %, del modo más preferente no más de un 95 % en peso/peso del contenido de agua de una verdura completamente hidratada o una de sus partes y/o una fruta o una de sus partes.

55 Sus derivados incluyen deshidrinas glicosiladas y deshidrinas truncadas, en las que las deshidrinas truncadas todavía contienen el segmento K crítico (véase a continuación).

60 Las posiciones adyacentes en la secuencia de amino ácidos están separadas por una coma y el amino ácido más frecuentemente observado se muestra en el primer lugar de la lista, estando cada amino ácido en una posición individual separado por un guión.

65 Sorprendentemente, los inventores han observado que aumentando la concentración de proteínas de deshidrina en el tejido de fruta y/o verdura anterior de origen natural, se obtiene un alimento seco rehidratable que, tras la rehidratación, tiene propiedades mejoradas de aspecto, textura y rehidratación. Al tiempo que la técnica anterior

sugiere que las proteínas LEA pueden jugar un papel importante en la protección de plantas frente al estrés hídrico, resulta sorprendente que el uso de deshidrina sola ha dado como resultado esta mejora de las propiedades de rendimiento anteriormente mencionadas de la fruta y/o verdura rehidratable seca, debido a que parece que actúan tres sistemas biológicos conjuntamente para lograr tolerancia frente al desecado.

5 A partir de los datos proporcionados por Roberts y col. (The Plant Cell, 5, 769-780 (1993)), se ha calculado que las semillas pueden comprender niveles de aproximadamente un 0,5 % en peso seco de deshidrina. No obstante, no existe consenso en la bibliografía sobre el porqué de estos niveles tan elevados. Las semillas, como tales, no constituyen el objeto de la invención y, por tanto, quedan excluidas.

10 Preferentemente, el alimento seco rehidratable comprende de un 0,02 a un 20, preferentemente de un 0,1 a un 5, del modo más preferente de un 0,2 a un 2,5 % en peso/peso de proteína de deshidrina y sus derivados. Los niveles naturales de proteína de deshidrina están por debajo de un 0,02 % en peso/peso. Preferentemente, la proteína de deshidrina y sus derivados tienen un peso molecular de 1 a 150, preferentemente de 5 a 100, del modo más preferente de 5 a 50 kD. Se prefieren las proteínas de deshidrina y sus derivados de peso molecular más bajo debido a que se pueden someter a infusión más fácilmente en el tejido de la fruta o verdura.

15 Preferentemente, la deshidrina y sus derivados proceden del grupo que consiste en *Camellia sinensis*, *Forsythia* y *Selaginella*, más preferentemente de *Camellia sinensis*, en particular con una secuencia de amino ácidos al menos un 80 % idéntica a SEQ. N^o. ID 1 (véase la figura 3b), preferentemente el menos un 90 %, un 95 % o un 99 % idéntica a la misma. Se observó que la deshidrina de SEQ. N^o. ID 1 estaba sobre-regulada x 47 cuando se marchitó el tejido de la planta de té, por tanto se postuló que esta deshidrina particular jugaba un papel importante en la protección del tejido de la planta durante el desecado. Posteriormente, se comprobó que éste era el caso a partir de los resultados explicados a continuación en la descripción detallada de la invención.

20 Otra *Camellia sinensis* preferida procedente de proteína de deshidrina (una forma truncada) tiene una secuencia de amino ácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ. N^o. 2 (véase la figura 4b), preferentemente al menos un 90 %, un 95 % o un 99 % idéntica a la misma.

25 Otra *Camellia sinensis* preferida procedente de proteína de deshidrina (otra forma truncada) tiene una secuencia de amino ácidos al menos un 80 % idéntica a SEQ. N^o. 3 (véase la figura 5b), preferentemente al menos un 90 %, un 95 % o un 99 % idéntica a la misma.

30 Se pensó que las versiones truncadas de deshidrina de té SEQ. N^o. 1 todavía contenían el segmento crítico K (véase a continuación) y las SEQ. N^o. 2 y 3 marcadas provocarían la infusión de manera más fácil y profunda en el tejido de la fruta y/o verdura y, de este modo, proporcionarían una actividad protectora en comparación con la forma de longitud completa (SEQ. N^o. ID 1). Las versiones truncadas también pueden tener una actividad funcional elevada debido a que se retiran parte de las áreas reguladoras de la proteína.

35 De manera adicional, el alimento rehidratable puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, glucosa, fructosa, rafinosa, una antioxidante enzimático o un secuestrante no enzimático de especie de oxígeno reactivo. Se piensa que las especies anteriores son capaces de proteger, por medio de una variedad de mecanismos, la integridad del tejido de fruta o verdura cuando experimenta deshidratación. Por ejemplo, se piensa que los azúcares protegen las membranas celulares durante el desecado en primer lugar por medio de la inducción de hidratación preferente de las estructuras celulares, y posteriormente sustituyendo el agua que protege la estructura celular. Los azúcares también pueden actuar como secuestrantes eficaces de radicales hidroxilo que controlan la producción mayor de especies de oxígeno radical observada durante el desecado. Las cadenas de transporte electrónico celular se encuentran impedidas tras la deshidratación y, además, generan cantidades mayores de intermedios de oxígeno reactivo. De este modo, cabría esperar que el antioxidante enzimático o un secuestrante no enzimático de especies de oxígeno reactivo mejorasen la capacidad del tejido de la fruta o verdura para resistir el desecado con un menor daño celular. Los antioxidantes enzimáticos apropiados incluyen catalasa, superóxido dismutasa, acorbato peroxidasa y glutatión reductasa. Especies no enzimáticas apropiadas de oxígeno reactivo incluyen ascorbato, glutatión y carotenoides.

40 La verdura puede estar seleccionada entre el grupo que consiste en espinaca, brécol, cebolla, berenjena, calabacín, patata, calabaza, champiñón, zanahoria, té, espárrago, nabo, puerro, remolacha, coliflor, apio, alcachofa, menta, tomillo, orégano, romero, perejil, salvia real, cebollino, mejorana, albahaca, laurel, estragón, apio y ajo y la fruta puede estar seleccionada entre el grupo que consiste en limón, frambuesa, grosella roja, zarzamora, fresa, arándano, piña, plátano, melocotón, albaricoque, lichis, manzana, pera, tomate, pimiento, pepino y mango.

45 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un producto alimenticio, que comprende un alimento rehidratable y seco de acuerdo con un primer aspecto de la invención. El producto alimenticio puede estar seleccionado entre el grupo que consiste en una sopa seca, una bebida seca, un cereal para desayuno, un yogur y una salsa seca. Todos los productos alimenticios anteriores se caracterizan por incluir un componente seco de fruta o verdura que se rehidrata con el uso.

En un tercer aspecto de la invención, un procedimiento de fabricación de un alimento rehidratable seco de acuerdo con el primer aspecto de la invención, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 5 (a) someter a infusión una verdura o una de sus partes, o una fruta o una de sus partes, excluyendo una semilla, con una proteína de deshidrina y sus derivados, comprendiendo la proteína de deshidrina y sus derivados una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en K, I, K, E, K, L, P, G; K, I, K, E/D, K, L/I, P, G; y K, I, K, E/D, K, L/I/T/V, P/H/S/G, para producir un alimento sometido a infusión; y
 10 (b) secar el alimento sometido a infusión para producir de este modo un alimento rehidratable seco de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La observación sorprendente del tercer aspecto de la invención es el hecho de que el alimento rehidratable seco que se obtiene tras rehidratación tiene propiedades mejoradas de aspecto, textura y rehidratación, por medio de difusión simple de deshidrina al interior del tejido de la fruta y/o verdura.

- 15 Preferentemente, la etapa (a) del tercer aspecto de la invención se puede llevar a cabo a vacío. Se anticipa que a vacío, la infusión es más rápida. La etapa (a) del tercer aspecto de la invención se puede llevar a cabo a una temperatura de 3 a 70, preferentemente de 10 a 50, del modo más preferente de 15 a 30 grados centígrados. A una temperatura demasiado baja, el proceso de infusión es demasiado lento, y a una temperatura demasiado elevada, la estructura del tejido experimenta daño.

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de fabricación de un alimento rehidratable seco de acuerdo con el primer aspecto de la invención, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 25 (a) clonar un gen para dar lugar a un vector de expresión de planta para, de este modo, producir un vector de expresión de planta modificado, en el que el gen codifica una proteína de deshidrina y sus derivados, en el que la proteína de deshidrina y sus derivados comprenden un secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en K, I, K, E, K, L, P, G; K, I, K, E/D, K, L/I, P, G; y K, I, K, E/D, K, L/I/T/V, P/H/S/G;
 30 (b) introducir el vector de expresión de planta modificado en el interior de un cultivo diana por medio de transformación de planta para, de este modo, producir un cultivo diana transgénico;
 (c) cultivar el cultivo diana transgénico para expresar la proteína de deshidrina y sus derivados; y posteriormente
 (d) secar el cultivo diana transgénico para, de este modo, producir un alimento rehidratable seco de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

- 35 En un quinto aspecto de la invención, se proporciona una proteína de deshidrina con una secuencia de amino ácidos idéntica a SEQ. N^o. 1 y sus derivados.

En un sexto aspecto de la invención se proporciona una proteína de deshidrina con una secuencia de amino ácidos idéntica a SEQ. N^o. 2 y sus derivados.

- 40 En un séptimo aspecto de la invención se proporciona una proteína de deshidrina con una secuencia de amino ácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ. N^o. 4, preferentemente al menos un 90 %, un 95 % o un 99 % idéntica a la misma, y sus derivados.

45 **Breve descripción de las figuras**

Ahora se ejemplifica la invención con referencia a las siguientes figuras en las que:

Figura 1 muestra la estructura característica de una proteína de una molécula de deshidrina generalizada que muestra motivos de secuencia conservados en la que el segmento Y está normalmente ubicado hacia el extremo de nitrógeno, los segmentos ϕ son regiones repetidas formadas en su mayoría por glicina y amino ácidos polares, el segmento S contiene un tracto de residuos de serina aptos para fosforilación y el segmento K es rico en lisina y constituye la hélice- α anfifática putativa que forma el dominio (la secuencias de letras se refieren a la correspondiente secuencia de amino ácidos);

Figura 2 muestra un placa de electroforesis de gel de dodecil sulfato de sodio / poliacrilamida (SDS-PAGE) de fracciones de deshidrina de *Selaginella lepidophylla* tras la purificación por medio de una columna de intercambio iónico de DEAE-Sepharose CL-6B en la que la columna (1) es el marcador de peso molecular (en kiloDalton), la columna (2) es el extracto total de *Selaginella lepidophylla* y las columnas (3) a (15) son las fracciones del extracto eluido con un gradiente de KCl 0,02M:1 M (la flecha indica la posición de la banda de deshidrina);

Figura 3 muestra un gen de deshidrina de té en forma esquemática en la figura 3a y en forma de nucleótido y secuencia de amino ácidos deducida en la figura 3b (SEQ. N^o. ID 1);

Figura 4 muestra la deshidrina de té de la figura 3 en forma truncada (truncado 122-201 de la SEQ. N^o. ID 1)

en forma esquemática en la figura 4a y en forma de nucleótido y secuencia de amino ácidos deducida en la figura 4b (SEQ. Nº. ID 2);

- Figura 5 muestra la deshidrina de té de la figura 3 en forma truncada (truncada 163-201 de la SEQ. Nº. ID 1) en forma esquemática en la figura 5a y en forma de nucleótido y secuencia de amino ácidos deducida en la figura 5b (SEQ. Nº. ID 3);
- Figura 6 muestra el nucleótido y la secuencia de amino ácidos deducida (SEQ. Nº. ID 4) del gen de deshidrina de *Forsythia suspensa*;
- Figura 7 muestra la placa de gel SDS-PAGE de deshidrina de té recombinante en la que la flecha indica la posición de la banda de proteína de fusión de deshidrina, la columna (1) los marcadores de peso molecular (kiloDalton), la columna (2) el sobrenadante de lisato celular *E. coli* inducida por IPTG que abriga la estructura de deshidrina-17 pDEST, la columna (3) proteínas no ligadas eluidas desde la columna de Ni-NTA tras la adición de la muestra, las columnas (4) a (8) las proteínas contaminantes eluidas tras sucesivos lavados de columna, y las columnas (9) a (15) las fracciones recogidas tras la aplicación del tampón de elución;
- Figura 8 muestra la placa de gel SDS-PAGE de deshidrina de té recombinante (364-606) en la que la flecha indica la posición de la banda de proteína de fusión de deshidrina, la columna (1) los marcadores de peso molecular (kiloDalton), la columna (2) el sobrenadante de lisato celular de *E. coli* inducido por IPTG que abriga la estructura de deshidrina-17 pDEST, la columna (3) proteínas no ligadas eluidas desde la columna de Ni-NTA tras la adición de la muestra, las columnas (4) a (8) las proteínas contaminantes eluidas tras sucesivos lavados de columna, y las columnas (9) a (15) las fracciones recogidas tras la aplicación del tampón de elución;
- Figura 9 muestra la placa de gel SDS-PAGE de deshidrina de té recombinante (487-606) en la que la flecha indica la posición de la banda de proteína de fusión de deshidrina, la columna (1) los marcadores de peso molecular (kiloDalton), la columna (2) el sobrenadante de lisato celular de *E. coli* inducido por IPTG que abriga la estructura de deshidrina-17 pDEST, la columna (3) proteínas no ligadas eluidas desde la columna de Ni-NTA tras la adición de la muestra, las columnas (4) a (8) las proteínas contaminantes eluidas tras sucesivos lavados de columna, y las columnas (9) a (15) las fracciones recogidas tras la aplicación del tampón de elución;
- Figura 10 muestra la placa de gel SDS-PAGE de deshidrina de *Forsythia* recombinante en la que la flecha indica la posición de la banda de proteína de fusión de deshidrina, la columna (1) los marcadores de peso molecular (kiloDalton), la columna (2) el sobrenadante de lisato celular de *E. coli* inducido por IPTG que abriga la estructura de deshidrina-17 pDEST, la columna (3) proteínas no ligadas eluidas desde la columna de Ni-NTA tras la adición de la muestra, las columnas (4) a (8) las proteínas contaminantes eluidas tras sucesivos lavados de columna, y las columnas (9) a (15) las fracciones recogidas tras la aplicación del tampón de elución;
- Figura 11 muestra pimientos rojos completamente secos y rehidratados tras la infusión (A) con agua, (B) deshidrina de *Selaginella lepidophylla* y (C) deshidrina de té expresada a partir de *Pichia pastoris*;
- Figura 12 muestra un gráfico de longitud frente a anchura de los trozos de tejidos de pimiento rojo rehidratados sometidos a infusión con diversas deshidrinas o agua y controles, en el que "Res Plt" se refiere a la deshidrina de *Selaginella lepidophylla* del ejemplo 1, "TD" se refiere a la deshidrina de té completa del ejemplo 2, "TD (364-606)" se refiere a una deshidrina de té truncada del ejemplo 2, "Forsythia" se refiere a deshidrina de *Forsythia* del ejemplo 2, "Materia Prima" se refiere a trozos de tejido de pimiento rojo de materia prima que se han secado y rehidratado de acuerdo con el ejemplo 5, "Agua-VI" se refiere a trozos de tejido de pimiento rojo de materia prima que se han sometido a infusión a vacío con agua, se han secado y posteriormente se han rehidratado de acuerdo con el ejemplo 5, y "Totalmente Material Prima" se refiere a trozos de tejido de pimiento rojo de materia prima.
- Figura 13 muestra gráficos de carga (N), frente a distancia (mm) para trozos de pimiento verde (*Capsicum*) que no han sido sometidos a infusión, secados y rehidratados (figura 13a), que no han sido sometidos a infusión pero no obstante se han secado y rehidratado de acuerdo con este ejemplo 6 (figura 13b), que se han sometido a infusión con agua, secado y rehidratado de acuerdo con el ejemplo 6 (figura 13c); y que se han sometido a infusión con deshidrina de *Selaginella lepidophylla*, secado y rehidratado de acuerdo con el ejemplo 6 (figura 13d);
- Figura 14 muestra hojas de espinaca sometidas a infusión con deshidrina de té (imágenes superiores) expresada en *Pichia pastoris* o agua (imágenes inferiores) tras secado (imágenes parte izquierda) y posteriormente rehidratadas (imágenes centrales) y microscopía óptica de una sección de una de

las hojas mostrada en las imágenes centrales (imágenes parte derecha);

Figura 15 muestra una microfotografía con luz visible (10 aumentos) de (a) una peladura epidérmica de cebolla viva teñida con azul de tripano y (b) peladura de epidermis de cebolla que se han blanqueado y posteriormente teñido con azul de tripano; y

Figura 16 muestra microfotografías con luz visible (10 aumentos) de peladuras epidérmicas de cebolla secas y rehidratadas teñidas con la captación de azul de tripano tras infusión con (a) deshidrina de té de longitud completa del ejemplo 2, (b) agua desionizada, (c) tampón de bis-tris trehalosa, y (d) BSA en tampón de bis-tris trehalosa.

Descripción detallada de la invención

Los genes de deshidrina están formados por distintos dominios que exhiben niveles elevados de conservación a través de especies de plantas. La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de la arquitectura generalizada de las deshidrinas. Cada proteína está formada por múltiples copias de los segmentos K, ϕ , S e Y. Por ejemplo, el segmento K puede aparecer hasta 11 veces por polipéptido, mientras que el segmento Y normalmente se encuentra en 1 a 3 repeticiones de tándem cerca del extremo de N. Los cuatro segmentos principales se encuentran entremezclados con otras regiones menos conservadas y normalmente repetidas. La estricta conservación de los segmentos K, ϕ , S e Y durante la evolución indica que definen unidades funcionales dentro de estas proteínas. Las deshidrinas se pueden caracterizar por la secuencia de aminoácidos K, I, K, E, K, L, P, G que se encuentra cerca del extremo carboxi que normalmente se repite dentro de la proteína. Esta secuencia de amino ácidos forma parte del segmento K. Más generalmente, el péptido terminal carboxi de deshidrinas que emerge a partir de una alineación de datos publicados disponibles es: E, K, K, G/S, I/V/M/L/F, M/L/V, D/E, K, I, K, E/D, K, L/I, P, G.

Ejemplo 1: Extracción y purificación de deshidrina de *Selaginella lepidophylla* de planta de resurrección

Se sondaron extractos de proteínas de *Selaginella lepidophylla* con un anticuerpo de deshidrina para detectar proteínas similares a deshidrina en tejidos de *Selaginella lepidophylla* (un tipo de planta de Resurrección que es una planta conocida por mostrar una marcada tolerancia a la sequía). Una vez identificadas, se purificaron las proteínas por medio de cromatografía de intercambio iónico.

a) Preparación del extracto de proteína completo a partir de tejido de *Selaginella lepidophylla*

Se molió una planta de *Selaginella lepidophylla* completa y totalmente hidratada que había sido deshidratada a temperatura ambiente durante cinco horas (de manera que estuviera parcialmente deshidratada) hasta obtener una consistencia harinosa en un molinillo de café. Se suspendió el polvo a una concentración de 200 g/l en un tampón de extracción a pH 6,0 pre-enfriado (4 grados centígrados) que contenía ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 25 mM (MES), NaCl 20 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF). Se agitó la suspensión durante 3 horas a 4 grados centígrados antes de mezclar en un mezclador durante 1 minuto, después de lo cual se agitó la fracción homogeneizada durante otras 12 horas a 4 grados centígrados. Se sometió el material insoluble a formación de pellas por medio de centrifugación a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 grados centígrados. Posteriormente, se filtró el sobrenadante a través de dos capas separadas de estopilla de algodón. Se desnaturalizaron las proteínas estables no térmicas por medio de incubación a 70 grados centígrados durante 10 minutos con agitación ocasional. Se enfrió rápidamente la disolución sobre hielo y se filtró a través de Papel Whatman N^o. 1. Se sometió cualquier material insoluble restante a formación de pellas por medio de centrifugación a 30.000 rpm durante 1 hora.

b) Detección de proteínas de deshidrina en extractos de proteína completa de *Selaginella lepidophylla* por medio de Inmunotransferencia

Se colocó una alícuota de ~ 20 μ l de extracto de proteína completa de *Selaginella lepidophylla* sobre un gel de electroforesis (12 % Novex bis(2-hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano (bis-tris) y se procesó durante aproximadamente 40 minutos a 200 V en un MES y tampón de dodecil sulfato de sodio (SDS) en circulación. Se sometieron a transferencia las proteínas del gel sobre una lámina de nitrocelulosa durante 1 hora a 30 V. Se bloquearon los sitios no ligados sobre la nitrocelulosa por medio de inmersión en disolución salina tamponada de tris(hidroximetil)aminometano (tris) que contenía un 5 % de polvo de leche seco (tampón de bloqueo) durante 1 hora. Posteriormente, se incubó la transferencia en anti-suero de deshidrina policlonal de conejo (Stressgen Bioreagents) diluido 1:1000 en el tampón de bloqueo durante 1 hora. Tras cuatro lavados consecutivos de 5 minutos con TBS que contenía 0,05 % de polisorbato 20 (Tween 20), se sumergió la nitrocelulosa en anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado en fosfatasa alcalina (Invitrogen). Tras cuatro lavados consecutivos de 5 minutos con TBS que contenía 0,05 % de polisorbato 20 (Tween 20), se detectó la deshidrina ligada conjugada por medio de la adición de 4 ml de una disolución de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/ azul de nitro tetrazolio (BCIP(NBT) (Sigma).

c) Purificación de la proteína de deshidrina a partir de extractos de proteína completa de tejidos de *Selaginella lepidophylla*.

Se sometieron a diálisis 20 ml de extracto de proteína completa de *Selaginella lepidophylla* durante la noche en tampón de pH 8,0 de tris HCl 10 mM, ácido etilenglicol tetracético 1 mM (EGTA), ditiotreitól 1 mM (DTT) a 4 grados centígrados. Se equilibraron 20 ml de agarosa reticulada con dietilaminoetilo basada en columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose CL-6B) con 500 ml del mismo tampón. Se hizo pasar el extracto sometido a diálisis a través de la columna a una tasa de aproximadamente 1 gota por segundo. Tras la adición de la muestra, se lavó la columna con 20 ml de tampón de columna. Posteriormente, se eluyeron las proteínas en fracciones de 4 ml por medio de la aplicación de 100 ml de un gradiente de KCl 0,02M:1M. Se identificaron las fracciones puras que contenían deshidrina por medio de electroforesis de gel de dodecil sulfato de sodio/poliacrilamida (SDS-PAGE), ilustrada en la figura 2, y se combinaron las fracciones 9 y 15 (que contenían deshidrina pura).

Ejemplo 2: Aislamiento de ADNc de deshidrina de *Camellia sinensis*, clonación de secuencias de deshidrina truncada y de longitud completa, y expresión y purificación de las proteínas de deshidrina recombinantes en *E. coli*

El procedimiento implicó las siguientes etapas:

- (a) Se construyó un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de brotes de té marchitos y no marchitos (*Camellia sinensis*);
- (b) Se seleccionó un ADNc para un contig de deshidrina de té presente únicamente en la biblioteca de ADNc marchito y representado por medio de 47 clones de ADNc independientes (más que ninguna otra deshidrina detectada);
- (c) se clonó la secuencia de deshidrina de ADNc seleccionada para dar lugar a un vector de expresión pDEST17 de *Escherichia coli* (*E. coli*) y se transformó en *E. coli*;
- (d) se multiplicó *E. coli* transformada en cultivo y se indujo para que expresara la proteína de deshidrina de té correspondiente;
- (e) se sometieron las células de *E. coli* a lisis y se purificó la proteína de deshidrina expresada usando una resina de ión níquel-ácido nitrotriacético (Ni-NTA); y
- (f) se sometió la deshidrina purificada a diálisis con agua antes de su uso.

ARN total aislado a partir de los brotes de té marchitos

Se recolectaron dos brotes de té (dos hojas y una yema) de *Camellia sinensis* variedad assamica y se marchitaron durante 19 horas (en una bolsa de plástico parcialmente sellada). Se aisló el ácido ribonucleico total (ARN) usando un estuche de aislamiento de ARN para plantas (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de ADNc a partir de ARNm para formar la biblioteca de ADNc

Se purificó ARNm a partir de 500 µg de ARN total usando un estuche de aislamiento de ácido poliadenílico (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se calentaron 5 µg de molécula de ácido poliadenílico-ARNm hasta 72 grados centígrados durante 5 minutos junto con 2,8 µg de primero de enlace de ácido poliadenílico que contenía un sitio de restricción de Xho1 (Stratagene), posteriormente se enfrió de forma instantánea sobre hielo durante dos minutos. Se transcribió de forma inversa ARNm en una reacción de 50 µl durante 60 minutos a 42 grados centígrados tras una incubación inicial a temperatura ambiente durante 10 minutos, usando 75 unidades de transcriptasa inversa (Stratascript RT de Stratagene) en un tampón 1 x RT (Stratagene), trifosfatos de desoxiribonucleótido 2,5 mM (dNTP's) (que comprendían desoxiadenosin trifosfato (dATP), timidín trifosfato (dTTP), 5-metil deosoxicitidin trifosfato y desoxiguanosin trifosfato (dGTP)) (Amersham-Pharmacia) y 40 unidades de bloque de ribonucleasa (ARNasa) (Stratagene).

Se sintetizó una segunda hebra de ADNc usando 45 µl de la reacción de síntesis de la primera hebra en una reacción de 200 µl durante 150 minutos a 16 grados centígrados por medio de la adición de 11 µl de ADN polimerasa (Stratagene), 20 µl de 10 x tampón de síntesis de segunda hebra (Stratagene), 6 µl de dNTP's (40 mM) (Amersham-Pharmacia) y 2 µl de ARNasa H (1,5 unidades/µl) (Stratagene). Se truncaron 180 µl de la reacción de síntesis de la segunda hebra durante 30 minutos a 72 grados centígrados por medio de la adición de 20,7 µl de dNTP's (10 mM) y 1,8 µl de ADN polimerasa Pfu clonada (Stratagene) (una enzima que se encuentra en *Pirococcus furiosus* archaon hipertermófilo) (2,5 unidades/µl). Se terminó la reacción por medio de extracción una vez con un volumen igual de 1:1 v/v de fenol/cloroformo y una vez con un volumen igual de cloroformo antes de la precipitación de ADNc durante la noche a -20 ° grados centígrados con 0,1 volúmenes de disolución de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol. Se re-suspendió ADNc en 9 µl de adaptadores EcoR1 (una enzima de endonucleasa aislada a partir de las cepas de *E. coli*) y se incubó a 8 grados centígrados durante la noche con 4 unidades de T4 ADN ligasa (Stratagene) (T4 es un bacteriófago de *E. coli*) en 1 x tampón de ligasa (Stratagene) + ribonucleótido 1 mM ATP (rATP) (Stratagene). Se terminó la reacción de ligado por medio de calentamiento a 70 grados centígrados durante 30 minutos y posteriormente se enfrió de forma instantánea durante dos minutos. A continuación, se fosforilaron los extremos de ADNc en una reacción de 22 µl a 37 grados centígrados durante 30 minutos por medio de la adición de 1 µl de T4 polinucleótido quinasa (10 unidades/µl) (Stratagene), 1 µl de tampón de ligasa (10x) y 1 µl de rATP (10 mM). Se terminó la reacción de fosforilación por medio de calentamiento de la reacción a 70 grados

centígrados durante 30 minutos. A continuación, se sometió el ADNc a digestión con una enzima de restricción Xho 1 (Stratagene) usando procedimientos convencionales de biología molecular. Se separó por tamaños el ADNc en 12 x 100 μ l fracciones haciéndolo pasar a través de una columna de 1 ml (volumen de lecho liso) (Chroma Spin-400 de Clontech) usando 1 x STE (NaCl 100 mM, tris(hidroximetil)aminoetano 20 mM - HCl (pH 7,5), EDTA 10 mM

- 5 (Stratagene) como tampón de columna. A continuación, se visualizaron 5 μ l de cada fracción sobre gel de electroforesis de bromuro de etidio - tris(hidroximetil)aminoetano-borato-EDTA de agarosa 1,2 % (TBE) (preparado de forma doméstica usando reactivos de Sigma). Posteriormente, se agruparon las primeras cuatro fracciones que contenían ADNc, se precipitó el etanol y se re-suspendió en 10 μ l de tris(hidroximetil)aminometano 10 mM (pH 7,6).
- 10 Se ligaron 10 ng de ADNc agrupado para dar lugar a 20 ng de vector digerido pBluescript SK + Xho1/EcoR1 (Stratagene) en una reacción de 5 μ l a 12 grados centígrados durante la noche usando 2 unidades de ADN T4 ligasa en un 1 x tampón de ligado + rATP 1 mM. Posteriormente, se transformó la biblioteca de ADNc en células XL10-Gold ultracompetentes (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se estimó el tamaño de la biblioteca de ADNc primario en 250.000 clones y el tamaño de inserto medio, 1072bP (pares de bases). Se escogieron a mano
- 15 2592 clones y se preparó el ADN para secuenciación.

Multiplicación de ADNc para secuenciación

- 20 Se sometieron a proliferación colonias durante la noche en 2,5 ml de caldo 2TY (16 g de triptona, 10 g de NaCl, 10 g de extracto de levadura (pH 7,3) por litro) (preparado de forma doméstica usando reactivos de Sigma) que contenía 100 μ g/ml de carbenicilina (Sigma) a 225 r.p.m. y 37 °C. Se aisló ADN de plásmido usando un estuche de minipreparación (96) de plásmido de composición (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se cuantificó el ADN y se diluyó con 50 ng/ μ l usando el estuche de cuantificación de PicoGreen ADN (Molecular Probes BV) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 25 Secuenciación de colas de secuencia expresadas, recopilación de contigs e identificación de homólogos

- Se llevó a cabo la secuenciación de ADN en un Analizador Genético de Applied Biosystems 3100 usando 5 μ l de matriz de ADN a 0,1 μ g/ μ l y 1 μ l de primero a 1 pmol/ μ g de acuerdo con los procedimientos convencionales de didesoxi secuenciación de fluorescencia. En total, se secuenciaron 1971 clones de cola de secuencia expresados (EST) y 1772 de ellos proporcionaron datos de secuencia de buena calidad. Se recopilaron estas secuencias de EST para dar lugar contigs. Se usó la secuencia de consenso de cada uno de estos contigs para la identificación de la función génica por medio de diferenciación frente a las siguientes bases de datos publicas EMBL "plantdna", "em_pl", "emnew_pl", "em_est_pl", "em_gss_pl", "em_nonpl", "emnew_nonpl", "em_est_nonpl" y "em_gss_nonpl".
- 30 Se usaron los programas de búsqueda TblastX y blastN y se analizaron -500.000 resultados en una base de datos. Se identificó un homólogo individual (anotado como el mejor) para cada uno de los genes de té (automatizado para genes EST individuales).

- 40 Un contig individual representado por medio de 47 clones de ADN independientes exhibió una homología significativa con respecto a AF220407, un ARNm de proteína de tipo deshidrina de Vitis riparia (Dhn) (puntuación de expectación 3e-11). La proteína de deshidrina de té exhibió todas las características típicas asociadas a un miembro de la familia de deshidrina. La secuencia contenía un segmento Y de N-terminal, un segmento S, segmentos ϕ y dos segmentos K cerca del extremo C-terminal y se muestra esquemáticamente y en actualidad (SEQ. N°. ID 1) en las figuras 3a y 3b respectivamente. No se representó ningún otro contig individual en forma de clones de ADN
- 45 independientes.

Clonación de deshidrinas de té de longitud completa y truncadas para dar lugar al vector de expresión pDEST17

- Se produjeron proteína de té de tipo salvaje de longitud completa y dos deshidrinas de té truncadas de acuerdo con las instrucciones de Gateway Expression System (Invitrogen). Se añadieron las secuencias attB (región extraña sometida a estudio técnico de Escherichia coli) (Invitrogen) a cualquier extremo de la secuencia de deshidrina a partir del vector ADNc (pBluescript de Invitrogen) en un proceso de reacción de cadena de polimerasa de dos etapas (PCR) por medio del uso de primeros específicos de matriz de deshidrina que contenían 12 nucleótidos attB (Invitrogen) (véase la Tabla 1). Se diseñaron primeros específicos alrededor de las secuencias de deshidrina de té de longitud completa y truncada para generar ADN de longitud completa o truncado. La segunda etapa añadió la secuencia attB universal (Invitrogen) a la secuencia de deshidrina de té de longitud completa o truncada, permitiendo la inserción en el vector pDONR 221 (Invitrogen). Posteriormente, se recombinó el vector pDONR 221 con vector de expresión bacteriana pDEST17 (con promotor T7 y sitio de unión a ribosomas) (Invitrogen) con codificaciones para los residuos de histidina a añadir a la deshidrina, permitiendo la purificación de la proteína.

- 60 Se diseñó la fracción truncada de deshidrina de té (números de desoxinucleótido 364-606) para que englobara ϕ de C-terminal y los dos segmentos K de la proteína. Se piensa que el dominio de segmento K altamente conservado es vital para la actividad de deshidrina. La fracción truncada de deshidrina de té más pequeña (números de desoxinucleótido 487-606) estaba formada únicamente por ϕ C-terminal y un segmento K. Las Figuras 2a y 5a muestran respectivamente la secuencia de nucleótidos esquemática para cada fracción truncada de deshidrina de té
- 65

y las figuras 4b y 5b el nucleótido actual y las secuencias de amino ácidos deducidas de cada fracción truncada de deshidrina de té (SEQ. ID 2 y 3 respectivamente).

Aislamiento y clonación de ADNc de deshidrina de *Forsythia suspensa* para dar lugar a pDEST17

5 Además de la deshidrina de té, se aisló otro gen de deshidrina por medio de reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) sobre ARN poliadenilado aislado a partir de corteza de *Forsythia suspensa*. La ausencia de la secuencia de *Forsythia* N-terminal significaba que fue precisa una estrategia alternativa para clonar la deshidrina de *Forsythia*. A partir de la secuencia de datos de amino ácido, se identificó un péptido corto T, D/E, E, Y, G, N, P, V, Q, H con homología con respecto a deshidrinas. La presencia de esta secuencia corta junto con los datos de la bibliografía, por ejemplo secuencias de amino ácidos conservadas de deshidrinas de angiospermas divulgadas en la tabla 1 de Close (Physiologica Plantarum, 100, 292-296 (1997)), ofreció un enfoque alternativo para clonar la deshidrina de *Forsythia*. Con el fin de lograr este objetivo, se diseñaron dos primeros de avance degenerados (FOR-D3 y FOR-D5) para el dominio de deshidrina de "segmento-Y" TN, D, E, Y, G, N, P (véase la figura 1) de acuerdo con Close (Physiologica Plantarum, 100, 291-296 (1997)). Esto tendría en cuenta la variación de los residuos de la región de consenso N-terminal entre una treonina y una valina. Por tanto, el primero para FOR-D4 (ACIGAYGARTAYGGIAAYCC) (SEQ. ID 5) utilizó treonina como primer amino ácido, al tiempo que FOR-D5 (GTIGAYGARTAYGGIAAYCC) (SEQ. ID 6) utilizó valina como primer amino ácido. Se diseñó el primero antisentido FOR-R2 (ARYTTYTCYTDDATYTTTRCCAT) (SEQ. ID 7) para el dominio "segmento-K" (E, K, K, G, I, M, D, K, I, K, E, K, L, P, G) (véase la figura 1) de acuerdo con Close (Physiologica Plantarum, 100, 291-296 (1997)). En las secuencias de primero anteriormente mencionadas, la letra "I" representa inosina (con enlaces con cualquier base) y se ha sustituido, en los listados de secuencias formateados y unidos, por "N" lo que conduce al mismo efecto técnico que inosina. Posteriormente, se usaron estos primeros para sintetizar la secuencia de ADNc de deshidrina de *Forsythia* usando ARN poliadenilado total extraído a partir de corteza de *Forsythia* como matriz por medio de RT-PCR. A continuación, se diseñaron los primeros para capturar los extremos 3' y 5' de ADNc de *Forsythia* usando el estuche de sistema GIBCO 5' RACE (Amplificación Rápida de los extremos de ADNc) versión 2,0 (Life Technologies).

30 Se insertó ADNc de *Forsythia* en un vector pGEM®-T Easy vector de Promega) y se clonó para dar lugar a pDEST17 como se ha descrito anteriormente, usando el Gateway Expression System (Invitrogen). La Figura 6 muestra el nucleótido de *Forsythia* y las secuencias de amino ácidos deducidas. La tabla 1 muestra los primeros usados para clonar la secuencia de deshidrina de *Forsythia* para dar lugar a pDEST17.

35 Tabla 1: Primeros de reacción de cadena de polimerasa (PCR) usados para generar secuencias de deshidrina flanqueadas por el sitio diana de recombinación attB (región extraña de *E. coli* sometida a estudio técnico)

Prímero	Secuencia de 5' a 3'	Secuencia Generada
12attB1 TD (SEQ. ID. 8)	AAAAAGCAGGCTTCATGGCACATAACAGCAAC	Deshidrina de té de longitud completa
12attB2 TD* (SEQ. ID. 9)	AGAAAGCTGGGTTTTATTTATTAGTGGTGGTGTG	
12attB1 TD (364-606) (SEQ. N°. ID. 10)	AAAAAGCAGGCTTCATGGAGGATGATGGTCAAG	Deshidrina de té truncada
12attB1 TD (487-606) (SEQ. ID. 11)	AAAAAGCAGGCTTCATGGCAGCCACCACCGGT	Deshidrina de té truncada
12attB1 FOR (SEQ. ID. 12)	AAAAAGCAGGCTTCCTGCACTACTGAACAACTTAG	Deshidrina de <i>Forsythia</i>
12attB2 FOR (SEQ. N°. ID. 13)	AGAAAGCTGGGTTTCATAAACTCGACTCAGACGCATG	Deshidrina de <i>Forsythia</i>
* 12attB2 TD también se usó como primero inverso para la deshidrina de té (364-606) y la deshidrina de té (487-606)		

Expresión en *E. coli* y purificación de proteínas de deshidrina recombinantes

40 El vector de expresión bacteriana pDEST 17 añade residuos de histidina consecutivos al extremo C-terminal de la proteína expresada. La cola de histidina permitió el aislamiento rápido de la proteína a partir de la fracción soluble de lisatos celulares por medio del paso a través de una matriz de afinidad por níquel que se une a una cola de histidina (Ni-NTA de Pro-Bound Purification System de Invitrogen). Se purificaron las proteínas de fusión de histidina expresadas en pDEST 17 a partir de *E.coli* usando Pro-Bond Purification System (Invitrogen). A continuación, se proporcionan detalles adicionales.

a) Cultivo celular y expresión de proteínas

50 Se transformó pDEST 17 que portaba diversas secuencias de deshidrina en cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen) (hospedadores BL21 químicamente competentes para mejorar el rendimiento de proteínas en un sistema de expresión basado en promotor T7). Se dispersaron células que albergaban estructuras de deshidrina pDEST 17 sobre placas de agar con caldo lysogeny (LB) que contenía 100 µg/ml de anfencilina y se incubaron a 37 grados centígrados durante la noche. Se inocularon 2,5 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de anfencilina con una colonia individual de estas células y se agitó a 37 grados centígrados durante la noche. Se usaron 2,5 ml de

cultivo para inocular 50 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de anfencilina y se agitó a 37 grados centígrados hasta que A_{600} (absorbancia a 600 nm) del cultivo fue de 0,6. Posteriormente, se indujo la expresión de proteína de deshidrina por medio de la adición de isorropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,5 mM. Se continuó la proliferación durante 5 horas adicionales en las mismas condiciones. Se recolectaron las células por medio de centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos y se almacenaron a -20 grados centígrados hasta que fue necesario.

b) Lisis celular

Se re-suspendieron pellas de células vigorosamente en 8 ml de Tampón de Unión (NaPO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 10 mM pH 8,0). Se añadió benzamidina de inhibidor de proteasa hasta una concentración final de 1 mg/ml. Se llevó a cabo la lisis por medio de cinco ciclos sucesivos de congelación instantánea en nitrógeno líquido seguidos de descongelación rápida en un baño de agua a 30 grados centígrados. Se añadió desoxirribonucleasa I (ADNasa I (una endonucleasa no específica que degrada ADN de hebra doble y sencilla y cromatina)) hasta una concentración final de 1 µg/ml y se incubó el lisato sobre hielo durante 30 minutos. Se sometió el material insoluble a formación de pellas por medio de centrifugación a 10.000 rpm durante 1 hora a 4 grados centígrados.

c) Purificación de proteína y análisis

Se añadieron 8 ml de sobrenadante de lisato de E. coli a 2 ml de resina de ácido nitroloacético-ión de níquel (Ni-NTA) que se había pre-equilibrado con Tampón de Unión. Se incubó la mezcla con agitación moderada durante una hora a temperatura ambiente para permitir la unión de la proteína con cola de histidina. Se retiró el material no unido en la fracción soluble por medio de centrifugación de la suspensión a 800 g (800 veces la fuerza de la gravedad) durante un minuto y se decantó el sobrenadante. Se retiraron contaminantes adicionales con cinco aplicaciones consecutivas de Tampón de Lavado (NaPO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 100 mM). Se eluyó la proteína con cola de histidina a partir de la resina por medio de centrifugación de 8 ml de Tampón de Elución (NaPO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 250 mM). Se recogieron fracciones en alícuotas de 1 ml y se analizaron por medio de electroforesis de gel con SDS-PAGE (figuras 7 a 10). Se llevó a cabo la electroforesis de gel SDS-PAGE usando un sistema de electroforesis NuPAGE (Invitrogen Ltd.). Por consiguiente, se combinaron las fracciones que contenían proteína de deshidrina. Se calculó la concentración de proteína relativa usando un Ensayo de Proteínas de Bradford (Bio-Rad).

Ejemplo 3: Expresión en Pichia Pastoris y purificación de proteína de deshidrina recombinante

Se llevó a cabo la expresión de la deshidrina de té de longitud completa en Pichia Pastoris y posterior purificación por medio de Invitrogen Corporation (1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008, EE.UU.) en forma de fabricación de la proteína por medio de facturación totalmente consolidada.

Ejemplo 4: Efectos de la infusión de deshidrina - observaciones y tejido rehidratado

Se prepararon trozos (1 cm³) de pimiento rojo (Capsicum) y se sumergieron por completo en 0,1 mg/ml de disolución de deshidrina (deshidrina de Selaginella lepidophylla obtenida a partir del ejemplo 1 o deshidrina de té expresada a partir de Pichia Pastoris como se obtuvo en el ejemplo 3) y se sometió a infusión a vacío durante dos horas a temperatura ambiente. También se prepararon trozos sometidos a infusión con agua como controles. Se secó el tejido de la planta sometido a infusión durante seis horas a 60 grados centígrados y se llevó a cabo la rehidratación por medio de inmersión en agua durante la noche a temperatura ambiente.

La Figura 11 ilustra la mayor rehidratación de los trozos de pimiento rojo que se sometieron a infusión con deshidrina, tanto la procedente de Selaginella lepidophylla (B) y la deshidrina de té expresada a partir de Pichia Pastoris (C) en comparación con el control (A) sometido a infusión con agua.

Ejemplo 5: Efectos de infusión con deshidrina - dimensiones del tejido rehidratado

Para evaluar el efecto de las diferentes deshidrinas sobre las dimensiones del tejido de pimiento rojo (Capsicum), después de la rehidratación, se infiltró una disolución acuosa de deshidrina a 0,5 mg/ml o agua sola en trozos de pimiento rojo, durante cuatro horas a temperatura ambiente, se secó durante 16 horas a 37 grados centígrados, y se rehidrató en agua a temperatura ambiente durante 4 a 5 horas. Normalmente, se usaron de 10 a 15 trozos de tejido de planta, preparado por medio del uso de un perforador de corcho circular de 1 cm de diámetro, para cada deshidrina. Como control, también se secaron trozos de tejido de pimiento rojo de materia prima y se rehidrataron de acuerdo con este ejemplo. La figura 12 muestra la longitud y anchura de las muestra rehidratadas, en la que "Res Plt" se refiere a la deshidrina de Selaginella lepidophylla del ejemplo 1, "TD" se refiere a la deshidrina de té completa del ejemplo 2, "TD (364-606)" se refiere a una deshidrina de té truncada del ejemplo 2, "Forsythia" se refiere a la deshidrina de Forsythia del ejemplo 2, "Materia Prima" se refiere a trozos de tejido de pimiento rojo de materia prima que se han secado y rehidratado de acuerdo con este ejemplo, "Agua-VI" se refiere a trozos de tejido de pimiento rojo de materia prima que se han sometido a infusión a vacío, se han secado y rehidratado de acuerdo con este ejemplo, y "Totalmente Materia Prima" se refiere a trozos de tejido de pimiento rojo de materia prima.

Las dimensiones medidas del tejido rehidratado indicaron una mayor rehidratación del tejido sometido a infusión con deshidrina en comparación con los controles que no se sometieron a infusión con deshidrina. De hecho, las dimensiones de tejido sometido a infusión con deshidrina están más próximas a las dimensiones de trozos nuevos sin tratamiento de infusión, secado o rehidratación.

5

Ejemplo 6: Efectos de la infusión de deshidrina - propiedades mecánicas de tejido rehidratado

Se sometieron a infusión a vacío (durante la noche a temperatura ambiente) 10 a 15 trozos de pimiento verde (*Capsicum*), preparado por medio del uso de un perforador de corcho circular de 1 cm de diámetro, bien con deshidrina de *Selaginella leipophylla* del ejemplo 1 en forma de disolución acuosa de 0,05 mg/ml o bien con agua. Posteriormente, se secaron los trozos sometidos a infusión de pimiento verde a 45 grados centígrados durante 7,5 horas y se rehidrataron (3 horas a temperatura ambiente). Posteriormente, se sometieron los trozos rehidratados a ensayos de compresión usando un máquina de Ensayo Mecánico Servohidráulico Dartec para evaluar sus propiedades mecánicas. Se sometieron a compresión, específicamente, los trozos hasta una altura de 2 mm a una velocidad de cruceta de 40 mm/s y se midió la carga (N) para llevarlo a cabo. La figura 13 muestra los resultados de las dos variantes sometidas a infusión (figura 13c para trozos sometidos a infusión con agua y la figura 13d para trozos sometidos a infusión con deshidrina de *Selaginella lepidophylla*), junto con controles para trozos de pimiento verde de materia prima que no habían sido sometidos a infusión pero, no obstante, secados y rehidratados de acuerdo con este ejemplo (figura 13b), y trozos de pimiento verde de materia prima que no habían sido sometidos a infusión, secados y rehidratados (figura 13a).

10

15

20

25

Los trozos sometidos a infusión con deshidrina de *Selaginella lepidophylla* rehidratados precisaron una fuerza mayor durante la compresión, en comparación con los controles no sometidos a infusión y sometidos a infusión con agua. Esto indica que los trozos sometidos a infusión con deshidrina rehidratados fueron más firmes que los controles rehidratados. La infusión con deshidrina dio lugar a resultados más próximos a los de los trozos de pimiento verde de materia prima que no habían sido sometidos a infusión, secados y rehidratados.

Ejemplo 7: Efectos de la infusión de deshidrina - observaciones de tejido de hoja

Se sumergieron hojas de espinacas en una disolución acuosa de 0,2 mg/ml de deshidrina de té expresada en *Pichia Pastoris* de acuerdo con el ejemplo 3, junto con un control de agua, posteriormente se sometieron a infusión a vacío durante tres horas a temperatura ambiente. Se deshidrataron las hojas sometidas a infusión a 40 grados centígrados durante la noche y posteriormente se rehidrataron hasta 3 horas a temperatura ambiente.

35

40

La figura 14 muestra imágenes de las hojas secas (imágenes de la parte izquierda) y hojas rehidratadas (imágenes centrales) junto con imágenes de microscopio óptico de la estructura interna de los tejidos rehidratados (imágenes de la parte derecha). Se puede observar que la espinaca sometida a infusión con deshidrina (imágenes superiores) tenía una hoja más grande, tras secado y rehidratado, en comparación con el control sometido a infusión con agua (imágenes inferiores), y una estructura de tejido menos colapsado y más abierto tras rehidratación. Esto indicó una mayor rehidratación de las hojas sometidas a infusión con deshidrina.

Ejemplo 8: Detección y cuantificación de deshidrina en material de plantas seco

a) Extracción y estimación de la deshidrina encontrada de forma natural en pimiento rojo

45

50

Se secó al horno pericarpio de pimiento rojo a 60 grados centígrados hasta peso constante, se pesó, se molió en un mortero bajo nitrógeno líquido, y se colocó el material molido en un tubo de Eppendorf de 2 ml, se sometió a extracción con Reactivo 1 de Extracción de Tejidos (Invitrogen) (que contenía tri(hidroxi metil)aminometano 50 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM, EDTA de 5 mM, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 1 mM, Na₂P₂O₇ 20 mM, NaN₃ 0,02 %, detergente y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM) en una extracción de 1 ml por cada 100 mg de material molido por medio de agitación durante 1 hora a 4 grados centígrados y centrifugación a 14.000 rpm, y se congeló de forma instantánea el sobrenadante y se almacenó a -80 grados centígrados. Se cuantificaron las proteínas totales usando el Ensayo de Proteína de Bradford (Bio-Rad).

55

60

Se colocaron 10 µl de extracto de proteína sobre gel de bis-(2-hidroxi-etil)-amino-tris(hidroxi metil)-metano 4-12 % SDS-PAGE. Se prepararon 10 µl de la deshidrina de té del ejemplo 3 a concentraciones de 0,5, 0,1 y 0,05 mg/ml y se colocaron sobre el gel. Se procesó el gel a 200 V durante 30 minutos para separar las proteínas. También se procesaron los estándares de proteína (All Blue Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad)) a lo largo de la muestra anteriormente mencionada.

65

Se transfirieron las proteínas desde el gel de SDS-PAGE sobre una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,2 µm (Invitrogen) en un módulo de transferencia semi seco. Posteriormente, se lavó la membrana de PVDF y se secó entre papel de filtro. A continuación, se incubó la membrana seca con proteínas transferidas en tampón de bloqueo (disolución salina tamponada de fosfato (PBS) con polisorbato 20 (Tween 20) para su uso como tampón de lavado y diluyente (PBST) + disolución de polvo de leche desnatada de 4 % (SMP), pH 7,2), durante 30 minutos y posteriormente se retiró. A continuación, se incubó la membrana durante 2 horas con anticuerpo policlonal anti-

deshidrina de conejo (Agrisera, Vannas, Suecia) a una dilución de 1:1000 en PBST + SMP. Tras 6 lavados consecutivos de 4 minutos en PBST, se incubó la membrana durante 1 hora con anticuerpos secundarios de inmunoglobulina G anti-conejo de mono afinipure conjugados con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD) a una dilución de 1:5000 en PBST + SMP. Tras la incubación, se lavó la membrana 6 x 4 minutos, posteriormente se drenó y se sometió a desarrollo usando un sustrato quimioluminiscente (tal como un sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico) y se sometió a formación de imágenes en un Sistema de Formación de Imágenes ChemiDoc-XRS (quimioluminiscencia) (Bio-Rad).

Se comparó la intensidad de las bandas de deshidrina de pimiento rojo sobre la membrana con la de aquellas de gradiente de concentración de los estándares de deshidrina y concentraciones relativas de deshidrina de pimiento rojo en pimiento rojo estimado a simple vista, y se retrocalcularon las cantidades presentes por gramo de núcleo de pimiento rojo seco. Los resultados indicaron que los niveles naturales de deshidrina en pimiento rojo varían desde no detectable hasta aproximadamente 20 % de la concentración de estándar de deshidrina más baja, es decir, aproximadamente 0,01 mg/ml equivalente a 0,1 mg de deshidrina por cada g de peso seco, o 0,01 % en peso/peso.

b) Infusión de pimiento rojo con deshidrina exógena y estimación de sus niveles

Se quitó la parte central de pericarpio de pimiento rojo usando un perforador de corcho circular de 1 cm de diámetro, se lavaron los trozos en agua y se transfirieron en seco sobre un papel de seda. Se preparó una disolución acuosa de 1 mg/ml de la deshidrina de té del ejemplo 3 y se usaron 2 ml de disolución para cubrir 3 núcleos de pimiento en un vaso de precipitados de 10 ml. Posteriormente, se sometieron estos trozos a infusión a vacío durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras la infusión, se lavaron los trozos tres veces con agua para retirar la deshidrina superficial y se transfirieron en seco sobre papel de seda. Se colocaron posteriormente los trozos sometidos a infusión en un horno con ventilador asistido con aire para secar hasta peso constante, comenzando a 40 grados centígrados durante 1 hora seguido de 60 grados centígrados durante 5 horas. Se sometió a extracción la proteína a partir de los trozos como se ha descrito anteriormente.

Se colocaron 2 μ l de extracto de proteína total sobre dos geles de bis-(2-hidroxi-etil)amino-tris(hidroximetil)metano de 4-12 % de SDS-PAGE. Se colocó un extracto procedente del pimiento rojo no sometido a infusión como control. Se colocaron 10 μ l de tres estándares de deshidrina pura (Invitrogen) a lo largo, en diferentes concentraciones (0,5, 0,1 y 0,05 mg/ml). También se procesaron marcadores moleculares (All Blue Precision Plus Protein Standards de Bio-Rad). Se procesó el gel a 200 V durante 30 minutos para separar las proteínas por peso molecular eficaz. Se transfirieron las proteínas procedentes de un gel a una membrana de PVDF y se sondaron con anticuerpo anti-deshidrina usando inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente para confirmar que las proteínas observadas en extractos tisulares sometidos a infusión a ~ 37 kD eran proteínas de deshidrina. El otro gel se tiñó durante 1 hora (es Simply Blue Safe Stain de Invitrogen) y posteriormente se eliminó el tinte durante la noche antes de la formación de imágenes. Se sometieron las proteínas, sobre el gel de SDS-PAGE teñido con el colorante, a formación de imágenes usando un sistema de formación de imágenes de gel (sistema de formación de imágenes Gel Logic 20 de Gel Logic) y se ajustaron las imágenes usando brillo, contraste e inversión para retirar el fondo y las áreas iluminadas de concentración de proteína intensa con el fin de permitir una estimación de la cantidad de deshidrina introducida por medio de infusión en el interior del tejido de pimiento rojo. Se retro-calculó la estimación de la concentración de deshidrina sobre el gel para estimar las cantidades presentes por gramo de tejido de pimiento rojo seco.

El extracto de pimiento rojo sometido a infusión mostró una banda de proteína intensa a ~ 37 kDa, equivalente en tamaño a la de la deshidrina pura introducida por infusión en el interior del tejido y usada para el gradiente de concentración, estando ausente esta banda en el control no sometido a infusión. La intensidad de la banda estuvo entre la correspondiente a 1 y 5 μ g de estándar de deshidrina puro colocado sobre el gel y la correspondiente a más de 1 μ g pero menos de 5 μ g por cada 2 μ l de extracto. Como el extracto era de 10 ml/gramo de tejido seco, la cantidad de deshidrina introducida por medio de infusión fue de aproximadamente 5 mg de deshidrina por cada g de tejido seco, pero no más de 25 mg/g (0,5-2,5 % en peso de deshidrina por peso seco).

Ejemplo 9: Efectos de infusión de deshidrina sobre monocapa de cebolla

Se usaron peladuras de epidermis de cebolla (*Allium cepa*) como sistema modelo de monocapa celular de planta. Se prepararon células epidérmicas (1 cm x 2 cm) y se sumergieron por completo en 0,1 mg/ml de disolución de deshidrina de *Camellia sinensis* de longitud completa (obtenida a partir del ejemplo 2) en tampón Bis-Tris 50 mM con trehalosa 0,25 M (tampón BTT). Se introdujo deshidrina por medio de infusión a vacío en el interior de tejido de cebolla durante dos horas a temperatura ambiente. También se prepararon peladuras de cebolla sometidas a infusión con agua, albumina de suero bovino de 0,1 mg/ml (BSA) en tampón BTT y únicamente tampón BTT, como controles. Se secaron 0,75 g de tejido de cebolla sometido a infusión durante la noche a 50 grados centígrados y se llevó a cabo la rehidratación por medio de inmersión en 25 ml de agua durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se montaron los tejidos rehidratados sobre portaobjetos de microscopio y se tiñeron in situ con azul de tripano 0,04 % (peso/volumen). Tras lavar con agua desionizada, se aplicaron cubreobjetos y se observaron los portaobjetos al

microscopio óptico (Leica DMRB) con 10 aumentos. Se usó una cámara digital de color (JVC KY-F75U) para la captura de imágenes (Soporte lógico JVC KY-LINK).

5 El azul de tripano es un colorante vital usado para visualizar la viabilidad celular. La Figura 15a muestra las células vivas o tejidos con membranas celulares intactas que excluyen el colorante a medida que es iluminado en las muestras de control de tejido nuevas. El colorante puede penetrar en las células con membranas celulares dañadas, por ejemplo en tejido blanqueado (blanqueado 2 minutos, agua hirviendo), lo que convierte al núcleo en claramente visible y parece que las membranas se separan de las paredes celulares como se muestra en la figura 15b.

10 La figura 16a muestra que la deshidrina introducida por medio de infusión en la peladura epidérmica de cebolla tras el secado y la deshidratación mostró escasa evidencia de daño tisular y los núcleos celulares no resultaron visibles. También parece que las células están hinchadas en comparación con los controles que no contienen deshidrina (figuras 16b-d), lo que indica una mayor rehidratación. En particular, los controles que no contenían deshidrina mostraron signos de daño tisular y los núcleos aparecen visibles. El alcance del hinchamiento celular en los
15 controles de agua (figura 16b) y tampón (figura 16c) fue menor que el de la muestra sometida a infusión con deshidrina, lo que indica una captación limitada de agua tras la rehidratación.

20 El hinchamiento del control sometido a infusión con BSA (figura 16d) fue intermedio entre el tejido sometido a infusión con deshidrina (figura 16a) y los controles de agua/tampón (figuras 16b y c), lo que indica una retención de agua en el interior de las células. No obstante, las membranas no estaban protegidas y se permitió el paso del colorante vital al interior de las células, lo que queda evidenciado por medio de tinción nuclear.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 1.- Un alimento rehidratable seco que comprende menos de un 10 % en peso/peso de agua y al menos un 0,02 % en peso/peso de una proteína de deshidrina y sus derivados, comprendiendo la proteína de deshidrina y sus derivados una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en K, I, K, E, K, L, P, G; K, I, K, E/D, K, L/I, P, G; y K, I, K, E/D, K, L/I/T/V, P/H/S/G, y en la que el alimento rehidratable seco es un tejido no roto de una verdura o una de sus partes y/o de una fruta o una de sus partes, y no una semilla, en el que el tejido no roto tiene la dimensión lineal más corta de al menos 0,5 milímetros, preferentemente una dimensión lineal más corta de 0,5 a 25, más preferentemente de 0,5 a 10 milímetros.
- 2.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende de 0,02 a 20, preferentemente de 0,1 a 5, del modo más preferente de 0,2 a 2,5 % en peso/peso de proteína de deshidrina y sus derivados.
- 3.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la proteína de deshidrina y sus derivados tienen un peso molecular de 1 a 150, preferentemente de 50 a 100, del modo más preferente de 5 a 50 kD.
- 4.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína de deshidrina y sus derivados son una deshidrina procedente del grupo que consiste en *Camellia sinensis*, *Forsythia* y *Selaginella*.
- 5.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína de deshidrina y sus derivados tienen una secuencia de amino ácidos al menos 80 % idéntica a la SEQ. N^o. ID 1, preferentemente al menos 90 %, 95 %, o 99 % idéntica a la misma.
- 6.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína de deshidrina y sus derivados tienen una secuencia de amino ácidos al menos 80 % idéntica a la SEQ. N^o. ID 2, preferentemente al menos 90 %, 95 %, o 99 % idéntica a la misma.
- 7.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína de deshidrina y sus derivados tienen una secuencia de amino ácidos al menos 80 % idéntica a la SEQ. N^o. ID 3, preferentemente al menos 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la misma.
- 8.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el alimento rehidratable comprende de manera adicional un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, glucosa, fructosa, rafinosa, un antioxidante enzimático o un secuestrante no enzimático de especies de oxígeno reactivo.
- 9.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el antioxidante enzimático está seleccionado entre el grupo que consiste en catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa.
- 10.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el secuestrante no enzimático de oxígeno reactivo está seleccionado entre el grupo que consiste en ascorbato, glutatión y un carotenoide.
- 11.- Un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la verdura está seleccionada entre el grupo que consiste en espinaca, brécol, cebolla, berenjena, calabacín, patata, calabaza, champiñón, zanahoria, té, espárrago, nabo, puerro, remolacha, coliflor, apio, alcachofa, menta, tomillo, orégano, romero, perejil, salvia real, cebollino, mejorana, albahaca, laurel, estragón, apio y ajo y la fruta puede estar seleccionada entre el grupo que consiste en limón, frambuesa, grosella roja, zarzamora, fresa, arándano, piña, plátano, melocotón, albaricoque, lichis, manzana, pera, tomate, pimienta, pepino y mango.
- 12.- Un producto alimenticio que comprende un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 13.- Un producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 12, que está seleccionado entre el grupo que consiste en sopa seca, una bebida seca, una cereal para desayuno, un yogur y una salsa seca.
- 14.- Un procedimiento de fabricación de un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) someter a infusión una verdura o una de sus partes, o una fruta o una de sus partes, excluyendo una semilla, con una proteína de deshidrina y sus derivados, comprendiendo la proteína de deshidrina y sus derivados una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en K, I, K, E, K, L, P, G; K, I, K, E/D, K, L/I, P, G; y K, I, K, E/D, K, L/I/T/V, P/H/S/G, para producir un alimento sometido a infusión; y

(b) secar el alimento sometido a infusión para producir de este modo un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

5 15.- Un procedimiento de fabricación de un alimento rehidratable seco de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la etapa (a) de la reivindicación 14 se lleva a cabo a vacío.

10 16.- Un procedimiento de fabricación de un alimento rehidratable seco de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que la etapa (a) de la reivindicación 14 se lleva a cabo a una temperatura de 3 a 70, preferentemente de 10 a 50, del modo más preferente de 15 a 30 grados centígrados.

10 17.- Un procedimiento de fabricación de un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

15 (a) clonar un gen para dar lugar a un vector de expresión de planta para, de este modo, producir un vector de expresión de planta modificado, en el que el gen codifica una proteína de deshidrina y sus derivados, en el que la proteína de deshidrina y sus derivados comprenden un secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en K, I, K, E, K, L, P, G; K, I, K, E/D, K, L/I, P, G; y K, I, K, E/D, K, L/I/T/V, P/H/S/G;

20 (b) introducir el vector de expresión de planta modificado en el interior de un cultivo diana por medio de transformación de planta para, de este modo, producir un cultivo diana transgénico;

(c) cultivar el cultivo diana transgénico para expresar la proteína de deshidrina y sus derivados; y posteriormente

(d) secar el cultivo diana transgénico para, de este modo, producir un alimento rehidratable seco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

25 18.- Una proteína de deshidrina con una secuencia de amino ácidos idéntica a SEQ. Nº. ID 1, y sus derivados.

19.- Una proteína de deshidrina con una secuencia de amino ácidos idéntica a SEQ. Nº. ID 2, y sus derivados.

30 20.- Una proteína de deshidrina con una secuencia de amino ácidos al menos 80 % idéntica a SEQ. Nº. ID 4 y al menos 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la misma, y sus derivados.

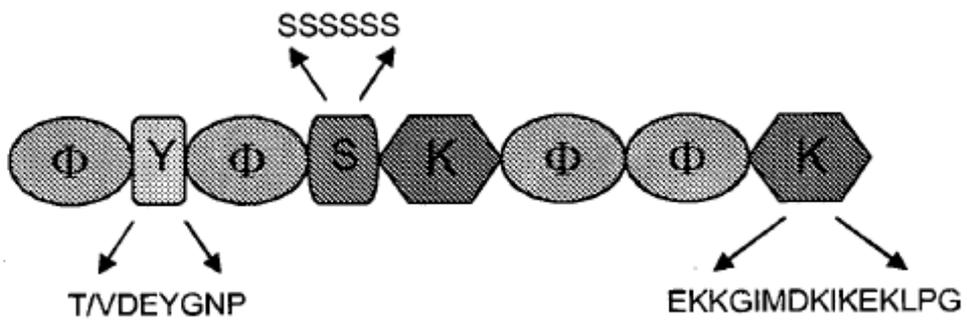


Figura 1

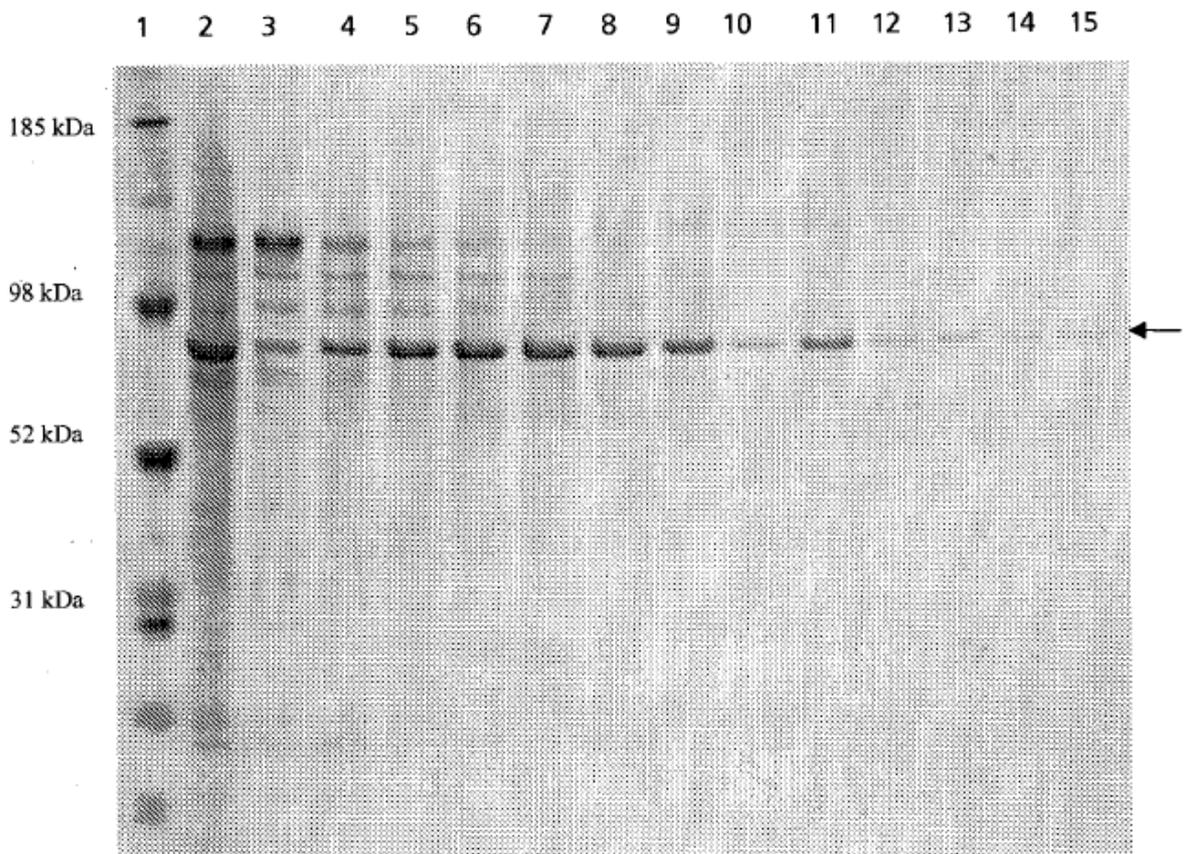


Figura 2

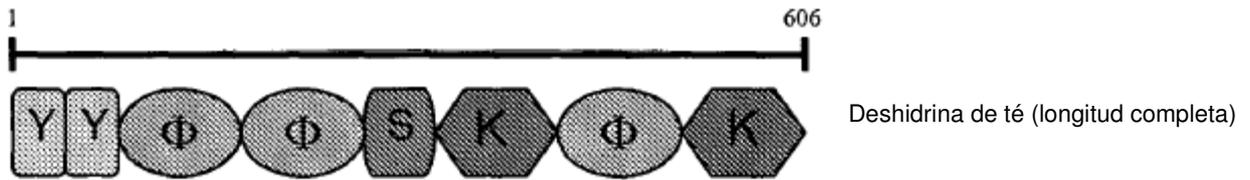
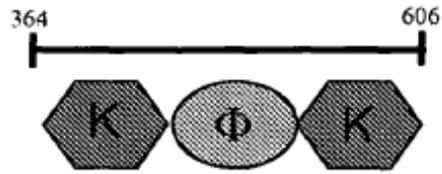


Figura 3a

```

1                                     M A H N S N Q Y
1                                     ATGGCACATAACAGCAACCAAT
9  G N P P R Q T D E Y G N P P R K T D E F
23 ATGGGAACCCACCTCGCCAAACTGACCGGTATGCGAAACCCACCTCGCAAACCGACGAGT
29  G D P V R Q I D E Y G N P V H H T G T M
83 TTGGTGACCCAGTTCGCCAAATTGACCGGTACCGAAACCCGTTTACCATACTGGTACCA
49  G D Y G T T T G T T G V H G T H T G T T
143 TGGGAGATTATGGTACCACTACCGGTACCACAGGTGTTTCATGCGACCCACCGCCACTA
69  G T Y G T G T T G T Y G T G M D T T G T
203 CGGGCACCTTATGGCACCGGCACCTACTGGCACCTTATGGCACCGGGATGGATACCACCGGTA
89  T G T H G L S T G T G G H H Q Q H A D G
263 CCACTGGTACCCATGGTTTGAGCACTGGTACCGGAGGCCATCATCAGCAGCATGCTGACG
109 G V L H R S G S S S S S S E D D G Q G G
323 GAGGAGTGCTTCACCGCTCCGGCAGCAGCTCTAGCTCTTCAGAGGATGATGGTCAAGGAG
129 R R K K K G L T Q K I K E K L P G G H K
383 GGAGGAGGAAGAAGAAAGGGCTGACACAGAAGATAAAGGAGAAGCTGCCAGGTGGGCACA
149 D Q T P Q Y D N T T T T P G A A T T G G
443 AAGACCAGACACCGCAGTACGACAACACAACCACCACTCCAGGAGCAGCCACCACCGGTG
169 Y G Y G G E D Q Q Q Y P E K K G M M E K
503 GCTATGGCTACCGGAGAGGACCAACAGCAGTACCCTGAAAAGAAAGGAATGATGGAGA
189 I K E K L P G H T T T N K
563 AGATCAAGGAGAAGCTTCCTGGCCACACCACCACTAATAAATAA
    
```

Figura 3b



Deshidrina de té
(truncada 364-606)

Figura 4a

```

122                                     E D D G Q G G
364                                     GAGGATGATGGTCAAGGAG
129  R R K K K G L T Q K I K E K L P G G H K
383  GGAGGAGGAAGAAGAAAGGGCTGACACAGAAAGATAAAGGAGAAGCTGCCAGGTGGGCACA
149  D Q T P Q Y D N T T T T P G A A T T G G
443  AAGACCAGACACCGCAGTACGACAACACAACCACCACTCCAGGAGCAGCCACCACCAGGTC
169  Y G Y G G E D Q Q Q Y P E K K G M M E K
503  GCRATGGCTACGGAGGAGGAGGACCAACAGCAGTACCCTGAAAAGAAAAGGAATGATGGAGA
189  I K E K L P G H T T T N K
563  AGATCAAGGAGAAGCTTCCTGGCCACACCACCACTAATAAATAA
    
```

Figura 4b

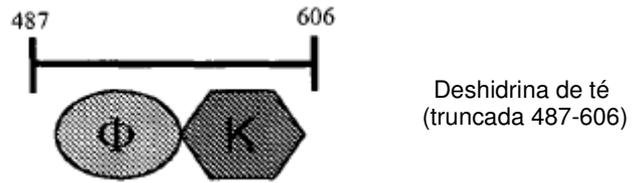


Figura 5a

```

163                                     A A T T G G
487                                     GCAGCCACCACCGTG
169   Y G Y G G E D Q Q Q Y P E K K G M M E K
503  @CYKRFUGCTACCGGAGAGGACCAACAGCAGTACCCTGAAAAGAAAGGAATGATGGAGA
189   I K E K L P G H T T T N K
563  AGATCAAGGAGAAGCTTCCTGGCCACACCACCACTAATAAATAA
    
```

Figura 5b

```

1 CTGCACTACTGAACAAACTTAGAAGTTGAACAATAGCTTGTTATTTGAGT

51 TTTGATAAACATTTGAAATTAGAAGAAATGGAGCAGTACGGGGACCAACA
   1                               M E Q Y G D Q H
101 CGGCAACCAGATACGCAAGACTGACGAATATGGAAACCCTGTTCAACACA
   9   G N Q I R K T D E Y G N P V Q H
151 CTGGAAAACAAGGAACTGGTCAAGGTGGAATTGCTCCAGGCACCCTTGAT
   25  T G K Q G T G Q G G I A P G T L D
201 GCTGGCCTAGCTGGGCAGCAACATGGCCAGCTCCGCCGCTCTGGCAGCTC
   42  A G L A G Q Q H G Q L R R S G S S
251 GTCGTCAGAGGATGATGGGCTAGGTGGGAGGAGAAAGAAGGGGATGAAGG
   59  S S E D D G L G G R R K K G M K
301 ACAAGATAAAGGAGAAGTTGCCTGGGGGGCACAAGGATGAGCAGAATTAC
   75  D K I K E K L P G G H K D E Q N Y
351 GGGACTCAAACAACACTACACCTGCAGGAGGCTACGGATGTGGTGGAGGAGA
   93  G T Q T T T P A G G Y G C G G G E
401 GCATCAGGAGAAGAAGGGAGTGGTGGAAAAGATCAAGGAGAAGCTGCCTG
  110  H Q E K K G V V E K I K E K L P
451 GAGGCGGCCACTAGATCACATCACTATGTTTCTAATAATGTTTTATACTA
  126  G G G H
501 TGTTGTCTTTAAAGTTTTAAGACATGCGTCTGAGTCGAGTTTATG
    
```

Figura 6

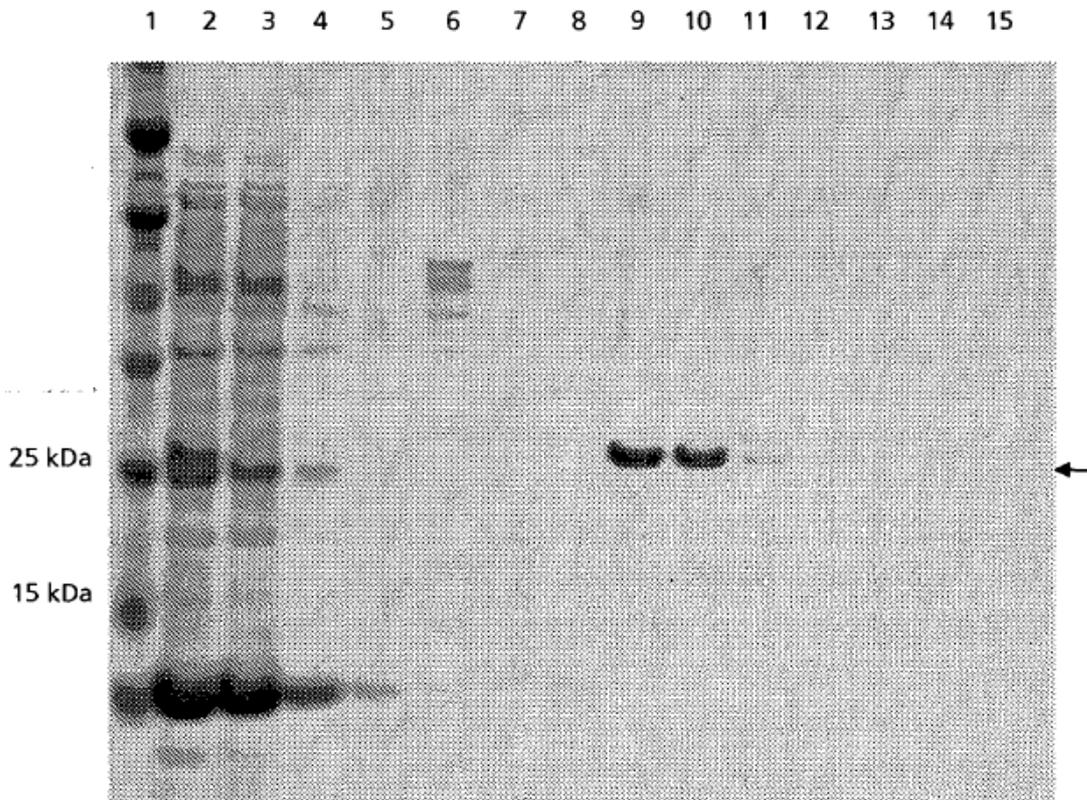


Figura 7

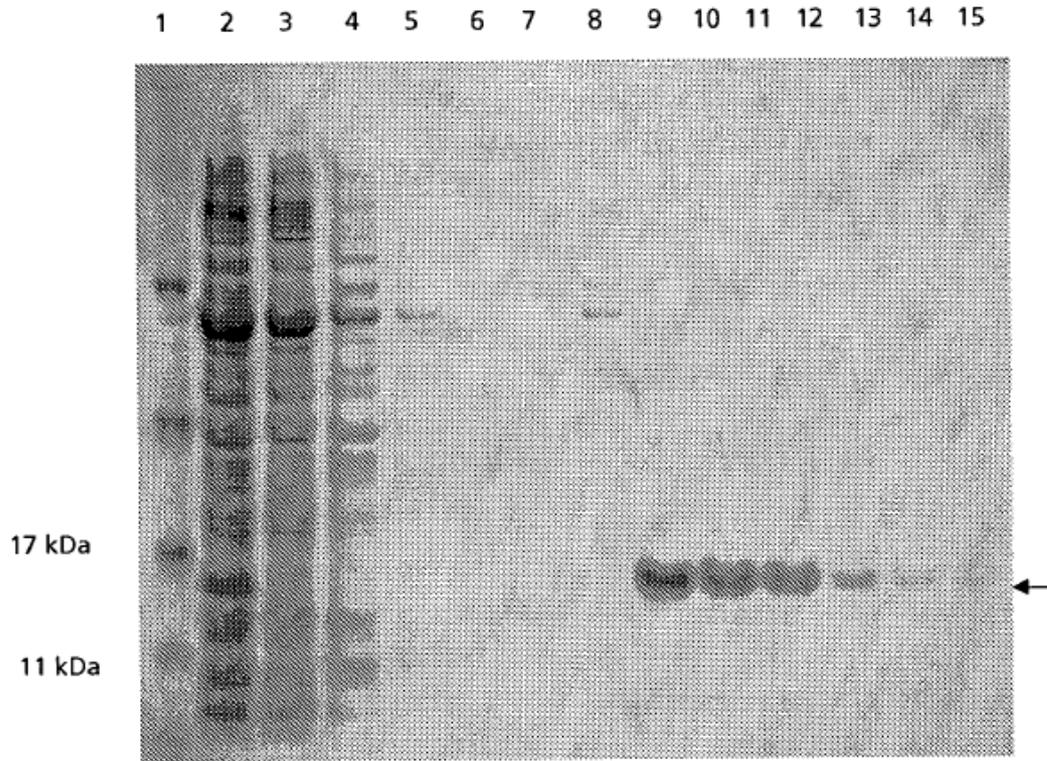


Figura 8

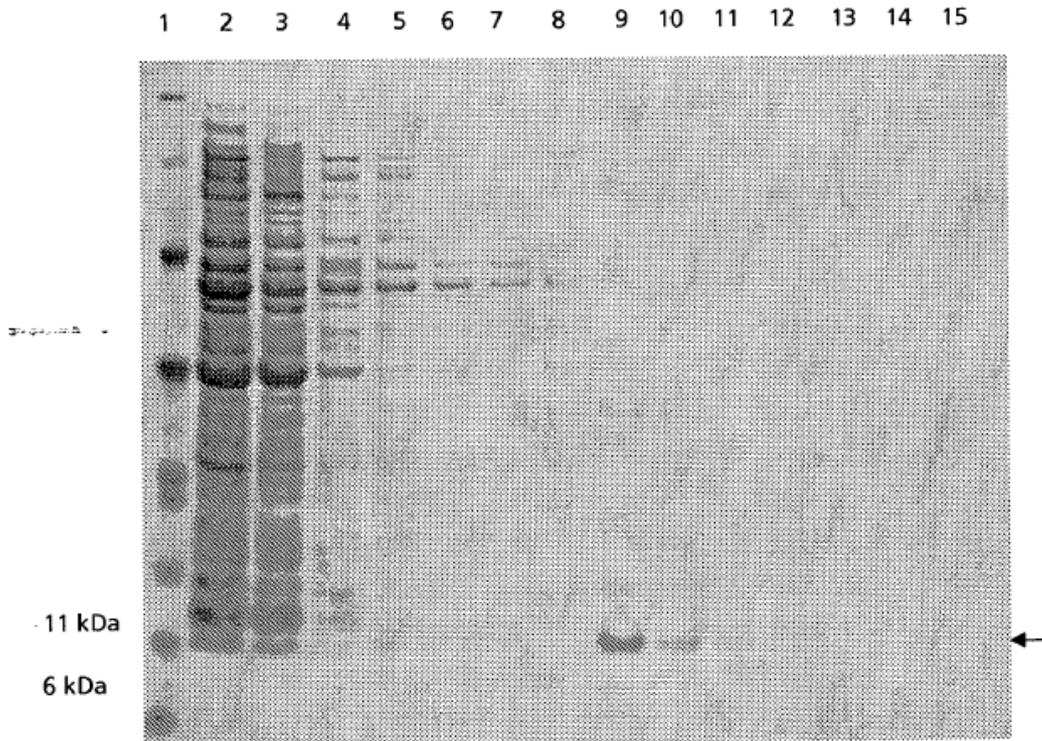


Figura 9

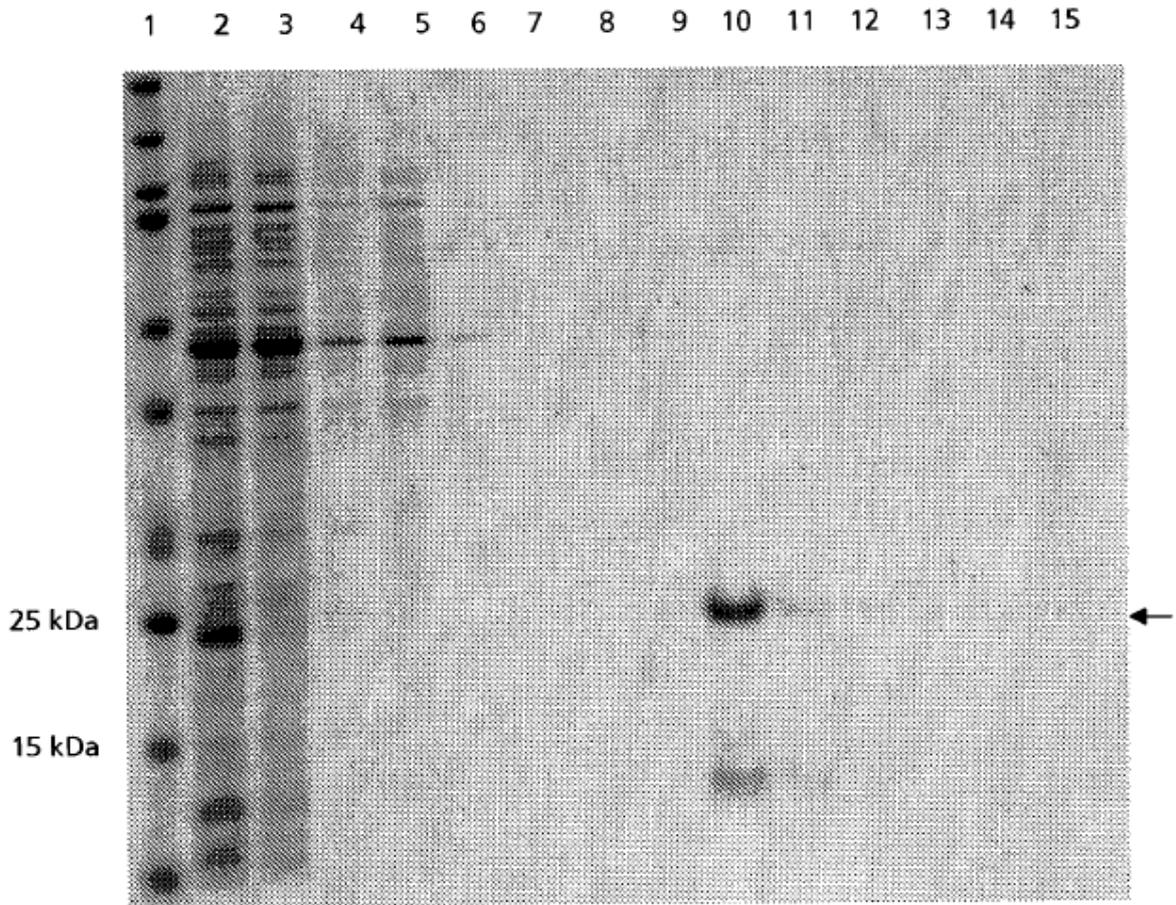


Figura 10

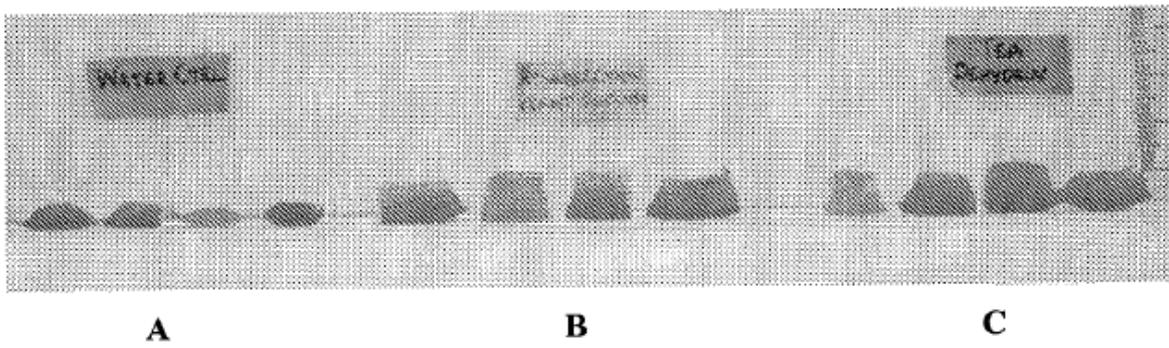


Figura 11

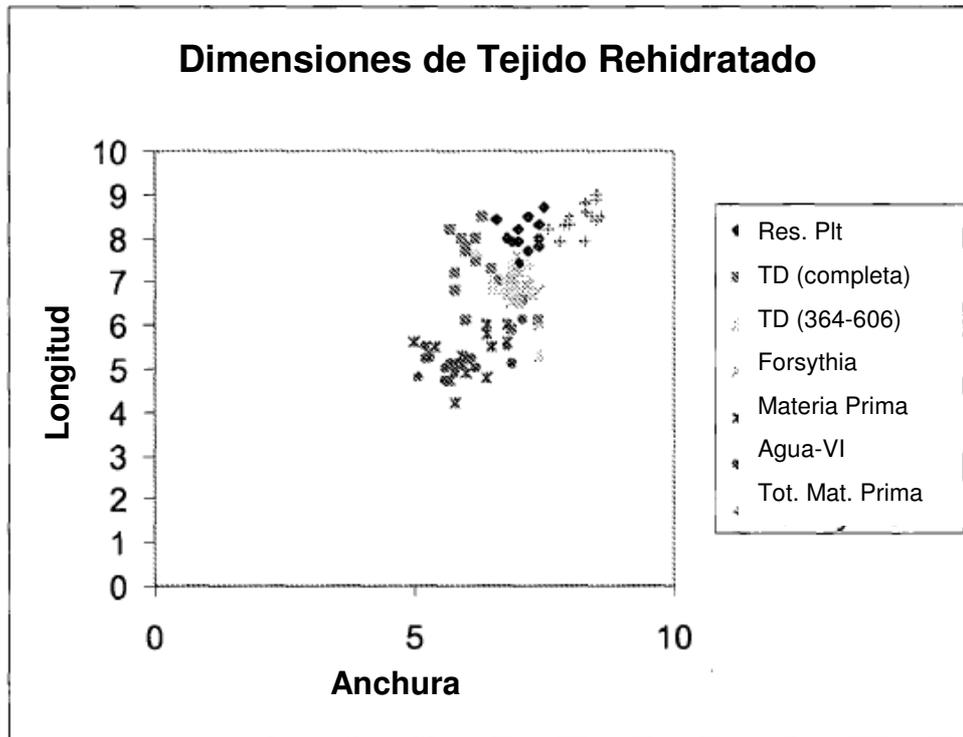


Figura 12

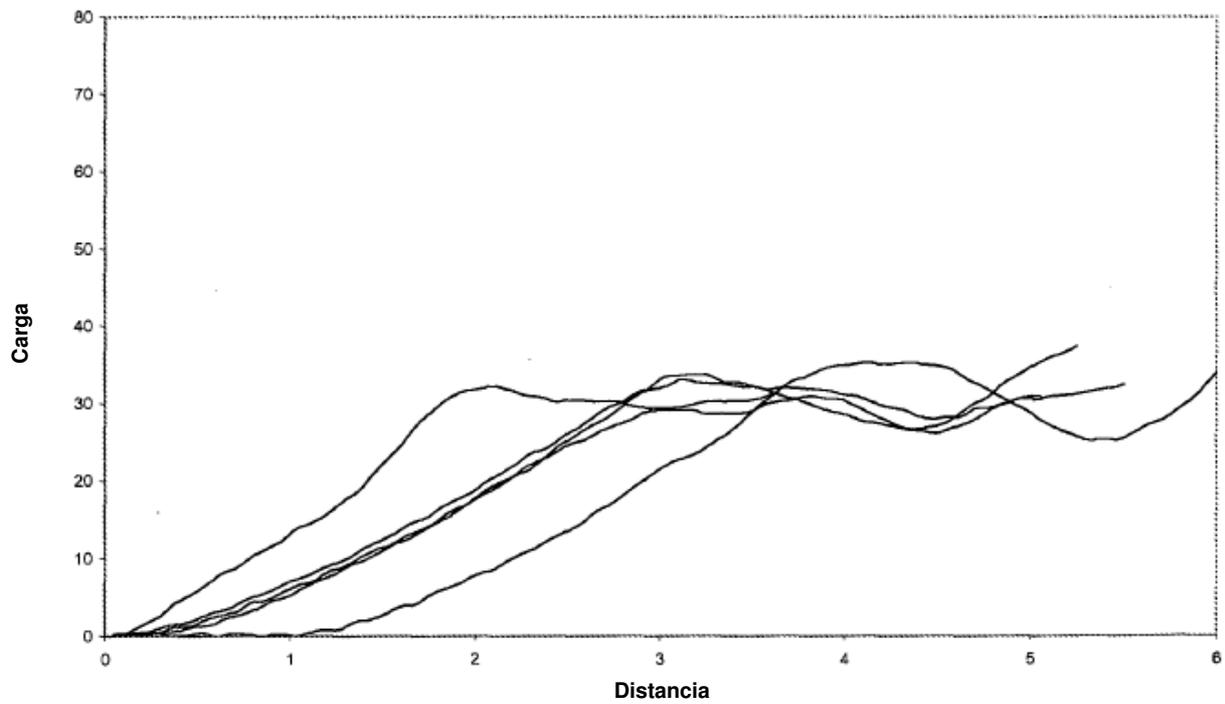


Figura 13a

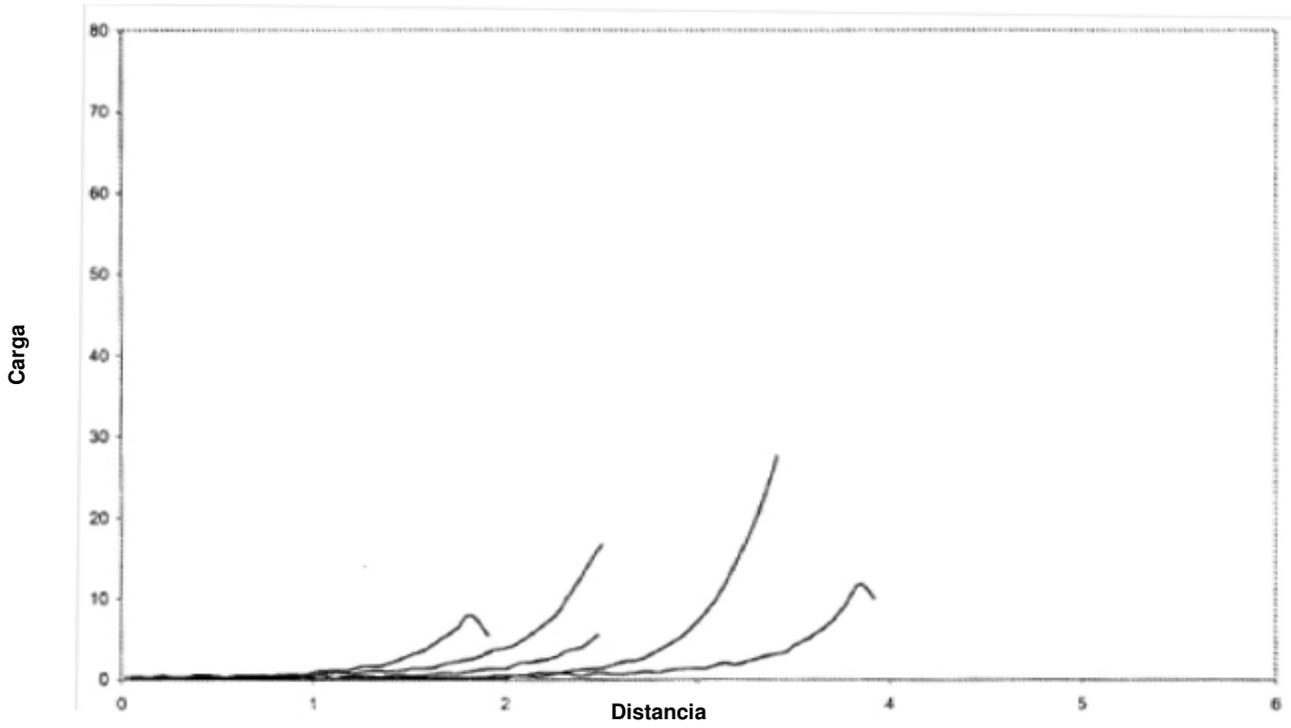


Figura 13b

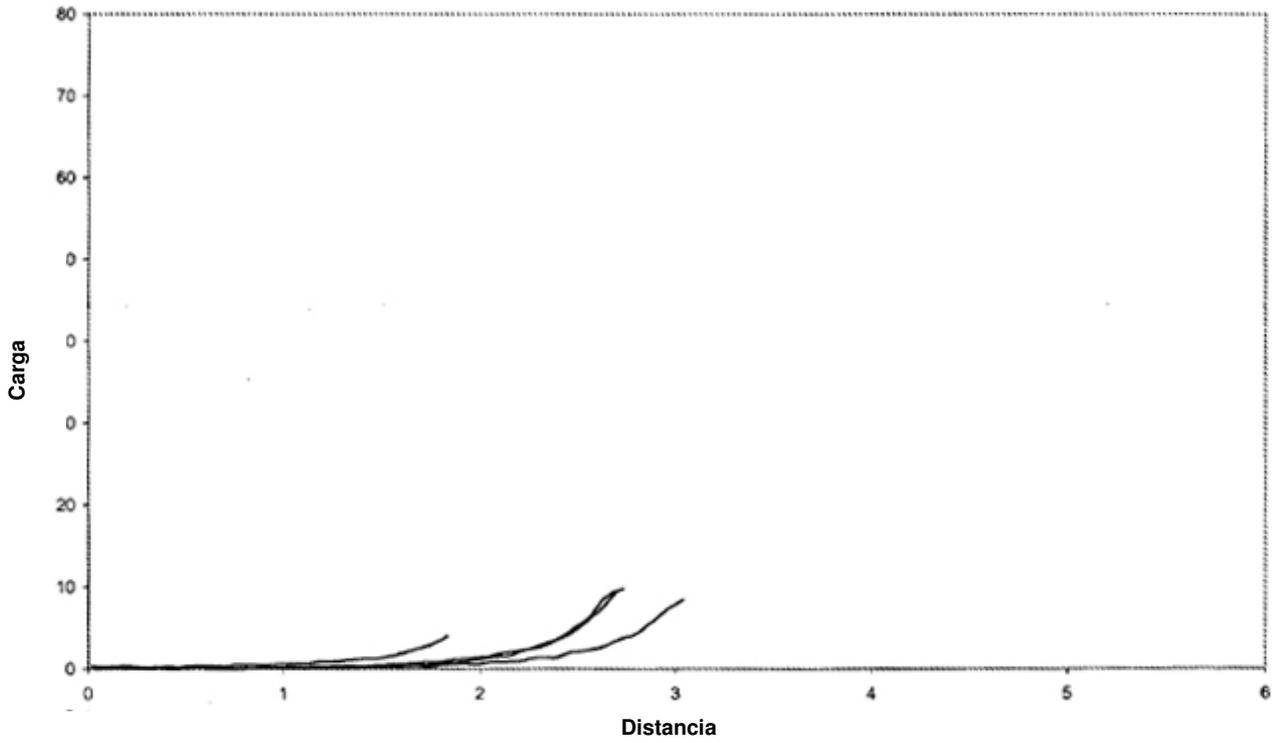


Figura 13c

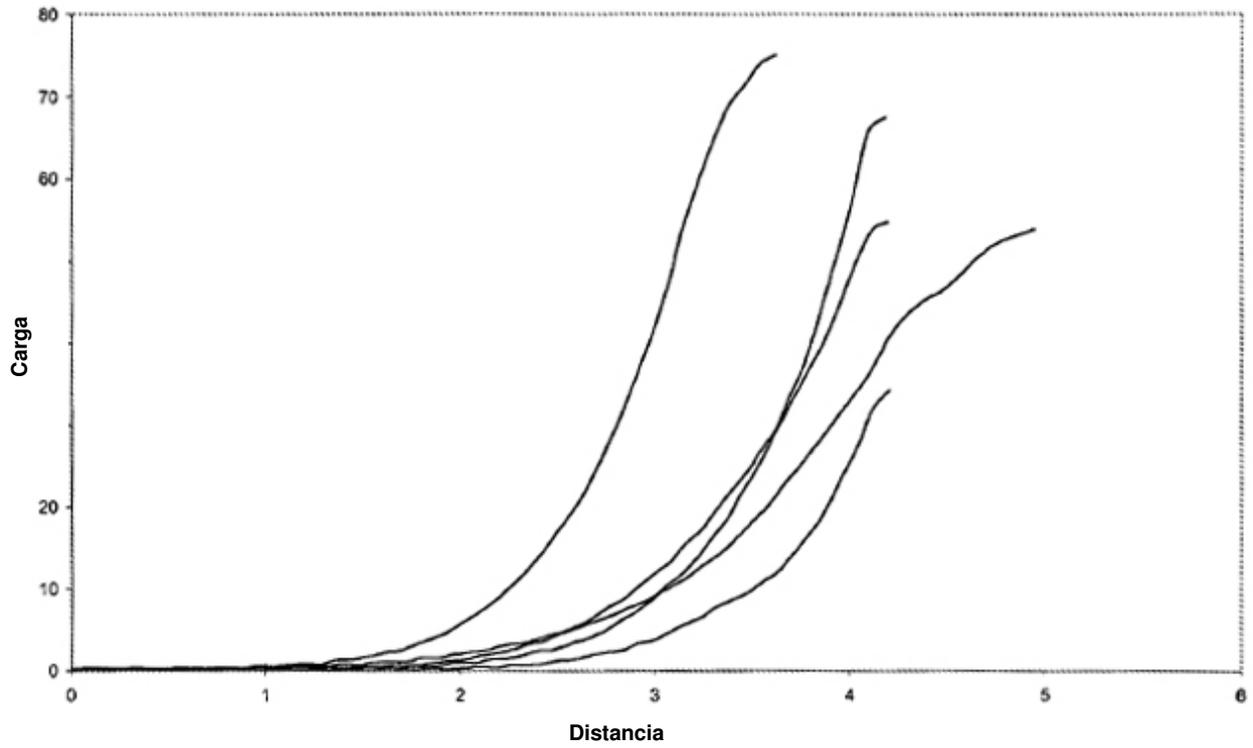


Figura 13d

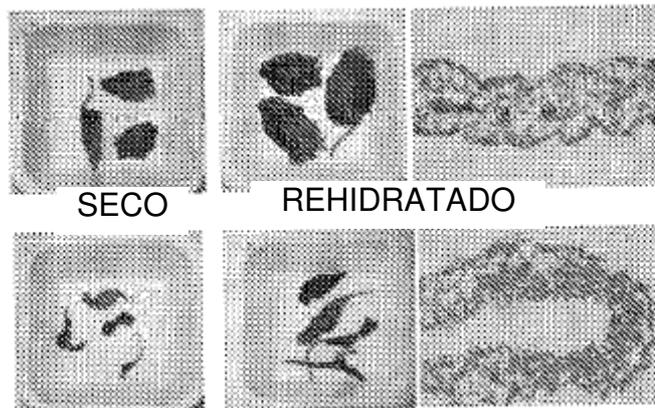


Figura 14

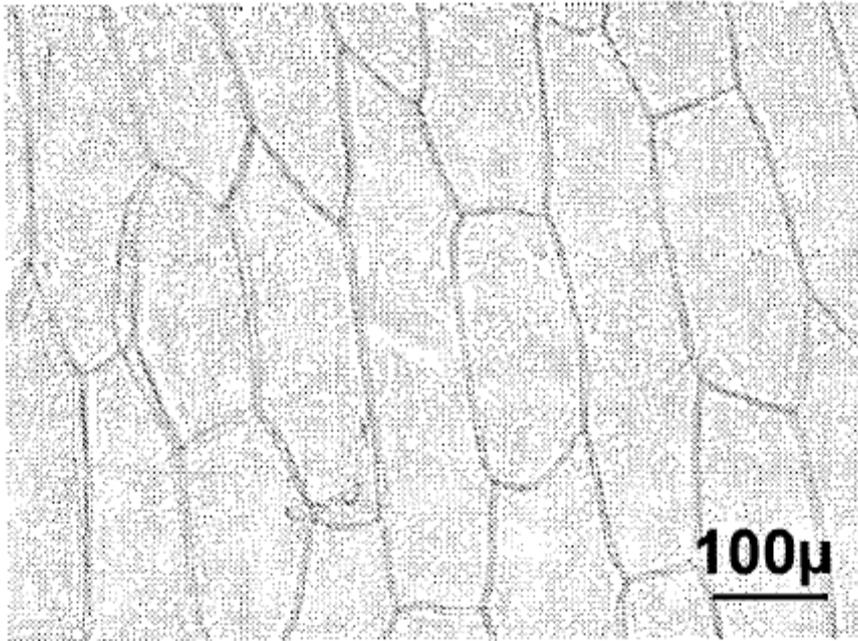


Figura 15a

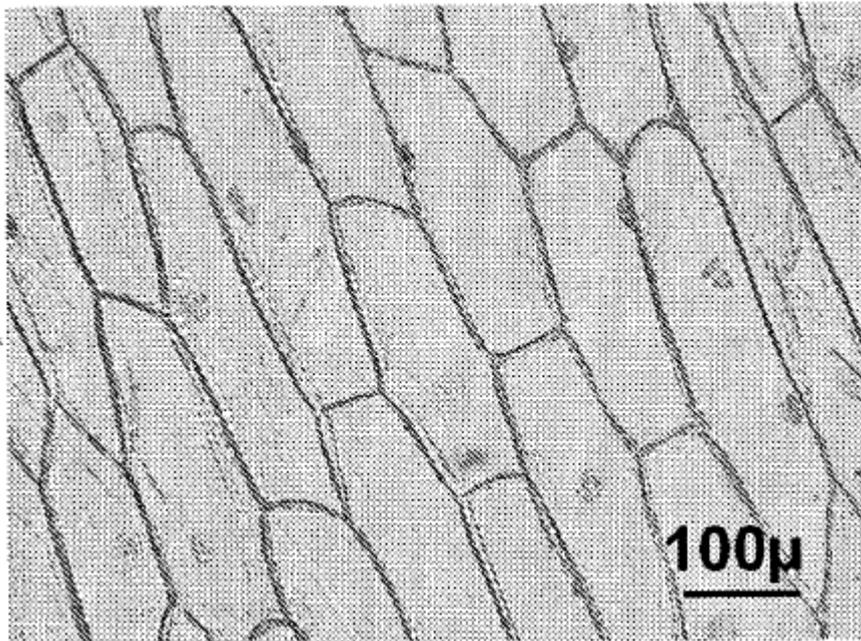


Figura 15b

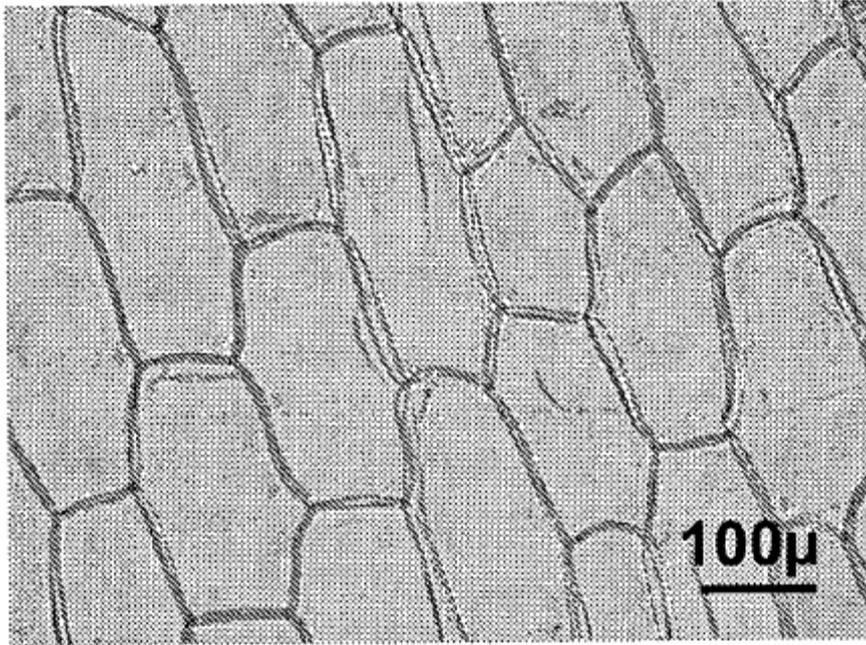


Figura 16a

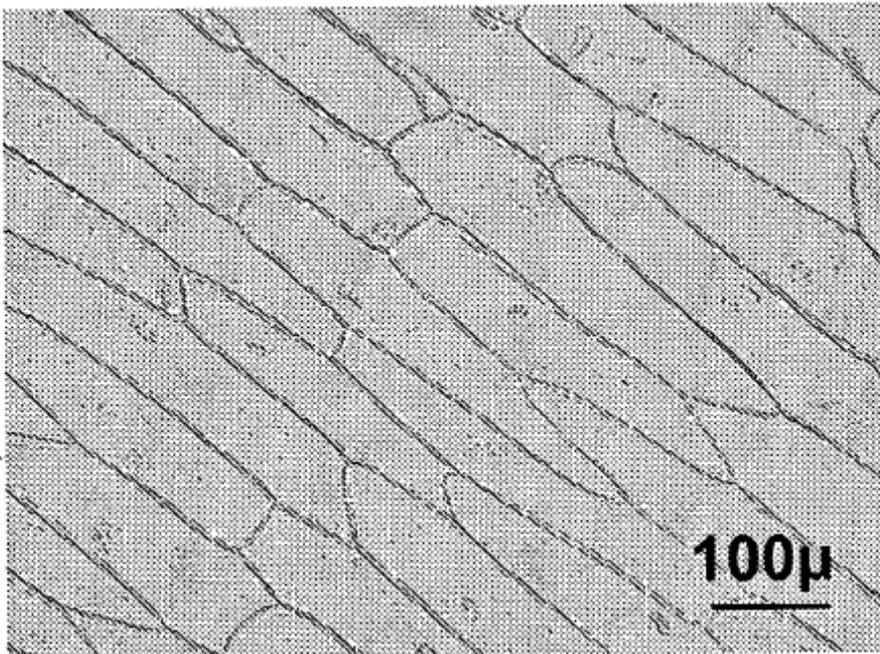


Figura 16b

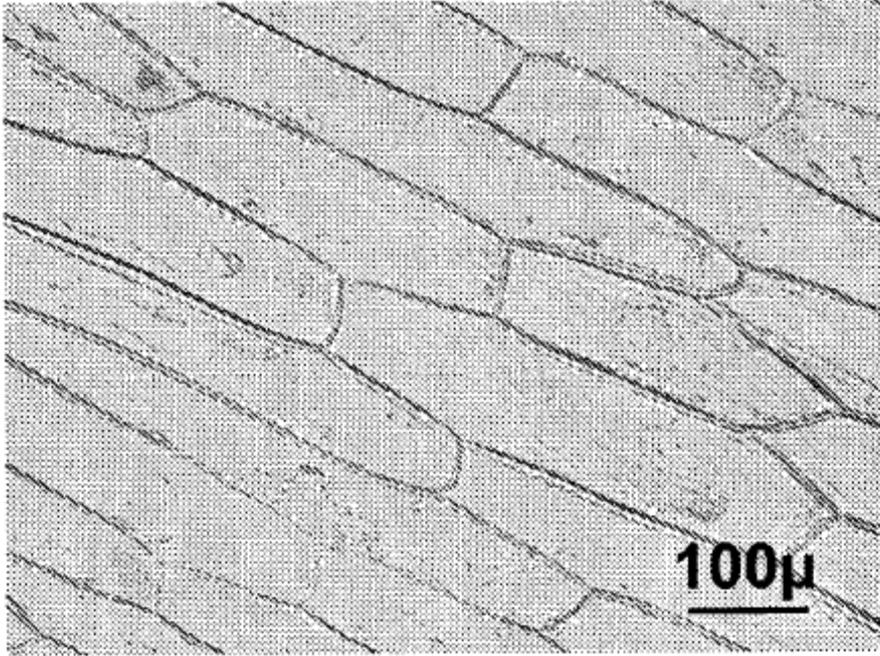


Figura 16c

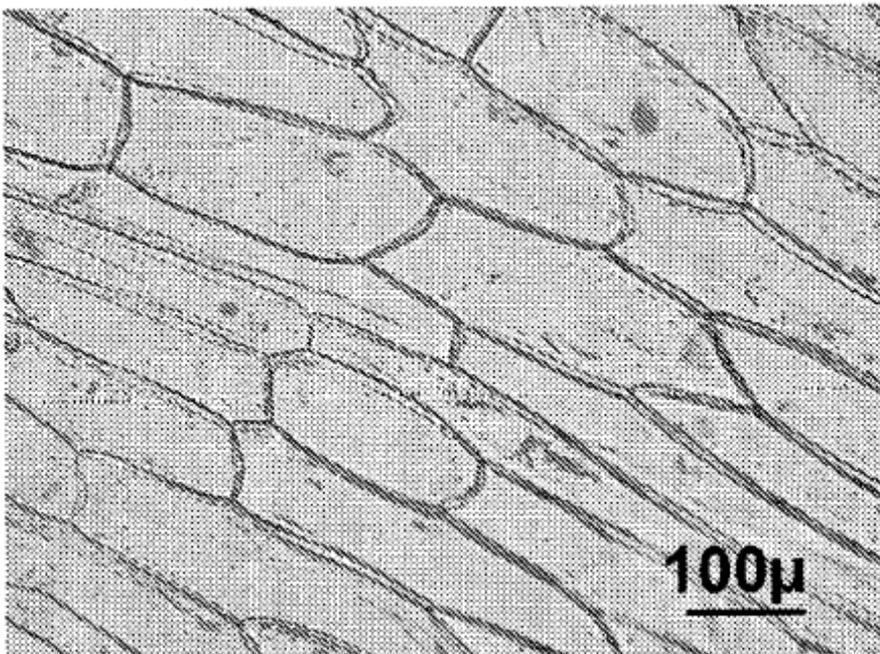


Figura 16d