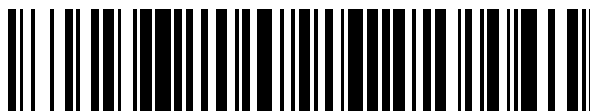


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 245**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/12 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2011 PCT/FR2011/051384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11736126 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2582810**

54 Título: **Ulvano liasa, procedimiento de fabricación y utilizaciones**

30 Prioridad:

18.06.2010 FR 1002588

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2016

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)**

**3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;**

**CENTRE D'ETUDE ET DE VALORISATION DES
ALGUES-CEVA (33.3%) y
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HELBERT, WILLIAM;
NYVALL-COLLEN, PI;
LERAT, YANNICK y
SASSI, JEAN-FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

VIGAND, Philippe

ES 2 588 245 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

Ulvano liasa, procedimiento de fabricación y utilizaciones

5 Campo técnico

La presente invención se refiere concretamente a ulvano liasas que tienen una actividad idurónico y glucurónico liasa extraídas del microorganismo depositado el 17 de junio de 2010 con el número I-4324 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (colección nacional de cultivos de microorganismos) (CNCM), 25 rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia, de 46 kD de secuencia SEQ ID N.º 4, a secuencias de ácidos nucleicos que codifican estas ulvano liasas, a vectores que comprenden estas secuencias codificantes, a un procedimiento de fabricación de estas ulvano liasas, así como a un procedimiento de degradación de ulvanos utilizando estas ulvano liasas.

La presente invención es aplicable concretamente en la valorización de los biorrecursos naturales constituidos por los organismos y los microorganismos que comprenden ulvanos, concretamente las algas verdes. En particular, la presente invención es aplicable en laboratorio, para el análisis de estos ulvanos, así como en agroalimentaria, en el campo de la cosmética y en el campo de los medicamentos y formulaciones farmacéuticas donde los productos de degradación de ulvanos son valorizables.

En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes [] remiten a la lista de referencias presentada al final del texto.

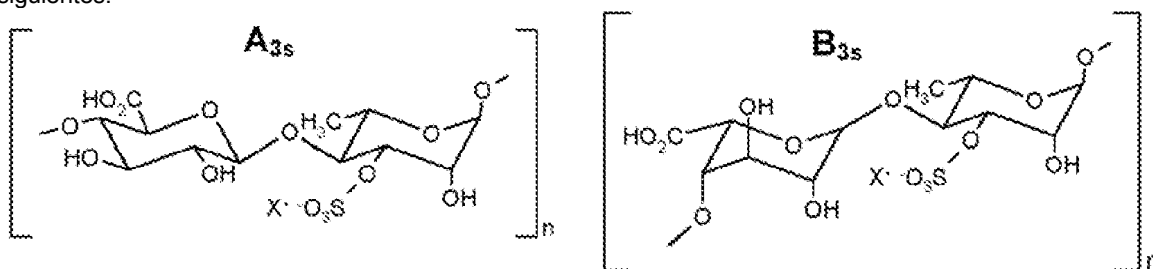
25 Estado de la técnica

Las algas verdes que pertenecen al género *Ulva* (*Ulva sp.* y *Enteromorpha sp.*) están presentes en todo el globo terráqueo y se encuentran muy habitualmente en las costas. Estas algas están frecuentemente implicadas en la proliferación algal favorecida por la eutrofización de las aguas costeras, que da lugar a las "mareas verdes".

Hasta el presente esta biomasa indeseable tenía un valor añadido muy reducido y se utiliza esencialmente como compost.

Los polisacáridos aniónicos complejos presentes en la pared de las ulvas, llamados ulvanos, poseen estructuras originales y representan una fuente de biopolímeros cuyas funcionalidades aún están poco aprovechadas.

Los ulvanos están compuestos por diferentes unidades de repetición disacarídicas construidas con unidades de ramnosa, ácidos glucurónicos, además idurónicos, xilosas y sulfatos. Los dos principales motivos de repetición se denominan ácido aldobiurónico, o ácidos ulvanobiurónicos, o respectivamente A (A_{3s}) y B (B_{3s}), cuyas fórmulas son las siguientes:



El motivo A (A_{3s}) es el ácido beta-D-1,4-glucurónico (1→4) alfa-L-1,4-ramnosa 3-sulfato. El motivo B (B_{3s}) es el ácido alfa-L-1,4-idurónico (1→4) alfa-L-1,4-ramnosa 3-sulfato.

Los ácidos urónicos son sustituidos a veces por residuos xilosa sulfatados en O-2.

Los ulvanos poseen propiedades fisicoquímicas únicas que hacen de ellos candidatos atractivos para nuevas aplicaciones agroalimentarias, farmacéuticas y cosméticas. Los ulvanos poseen estructuras muy originales compuestas por azúcares o monosacáridos raros como ramnosa y ácido idurónico. La ramnosa es un compuesto importante de los antígenos de superficie de numerosos microorganismos reconocidos específicamente por las lectinas de mamíferos. También se utiliza para la síntesis de aromas. El ácido idurónico se utiliza para la síntesis de glucosaminoglucanos, por ejemplo la heparina.

Además de los monómeros, los ulvanos y oligulvanos presentan propiedades biológicas interesantes. En efecto, trabajos han mostrado, por ejemplo, que los oligulvanos tienen actividades antitumorales, antivirales, concretamente antigripales, y anticoagulantes. Una lista no exhaustiva de aplicaciones potenciales de los ulvanos ha sido propuesta por M. Lahaye y A. Robic en el documento Structure and functional properties of ulvan, a

polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 2007, 8, 1765-1774 [1].

En este contexto, una mejor comprensión de la estructura de los ulvanos y el desarrollo de procedimientos que permitan fragmentar los ulvanos en forma oligomérica o monomérica reviste un gran interés.

La solicitud internacional PCT WO 2009/016275 describe una "sustancia enzimática" purificada a partir de un microorganismo, a saber la cepa *Ochrobactrum* apta para cortar el enlace osídico por β -eliminación. En particular, esta solicitud describe únicamente una "solución" o "medio" que comprende una actividad enzimática. Se trata concretamente de la obtención de la sustancia enzimática a partir de *Ochrobactrum tritici* que proviene del suelo.

El documento Lahaye M et al: "Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvane-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp." *Carbohydrate Research*, Pergamon, GB, Vol. 304, n°3-4, 28 de noviembre de 1997, págs. 325-333; describe una bacteria que posee una actividad enzimática que degrada los ulvanos constituida por una mezcla de proteínas. También describe el aislamiento de una bacteria marina a partir de lodos y un procedimiento de degradación de ulvano que comprende la incubación de las bacterias en un medio de cultivo y la adición de solución de ulvano en el medio de cultivo y la medición de las constantes catalíticas.

Actualmente, a falta de medios que permitan conocerlas mejor y degradarlas eficazmente, las algas, concretamente las algas verdes, son esencialmente compostadas y no se realiza ninguna valorización industrial. Esto es tanto más deplorable en cuanto la fuente es abundante y a veces molestas en términos de contaminación de las costas marítimas. Su eliminación se realiza actualmente por vía de compost.

Existe, por lo tanto, una necesidad real de encontrar nuevos medios de degradación de los ulvanos para poder valorizar este biorrecurso, obtenido concretamente de las algas verdes, produciendo fragmentos oligoulvanos a demanda en la perspectiva de aplicaciones cosméticas, agroalimentarias y médicas.

Exposición de la invención

La presente invención tiene, precisamente, como objetivo responder a esta necesidad proporcionando ulvano liasas que degradan muy eficazmente los ulvanos mediante despolimerización. El estudio de las modalidades de reconocimiento de las enzimas de la presente invención realizado por los inventores demuestra su actividad glucurónico liasa.

Los inventores han demostrado también la actividad idurónico y glucurónico liasa.

Los inventores proporcionan en particular ulvano liasas extraídas del microorganismo depositado con el número I-4324 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia. Este microorganismo se denomina también en la presente y en los documentos de depósito en la CNCM "01-PN-2010".

En otras palabras, Los inventores proporcionan, en particular, una ulvano liasa extraída del microorganismo de origen marino depositado con el número I-4324 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia, de 46 kD de secuencia SEQ ID N.º 4.

Las ulvano liasas, llamadas también proteínas ulvanolíticas, también se describen y pueden ser, por ejemplo, de 30 o 46 kD y comprender en su secuencia peptídica las cuatro secuencias siguientes:

PNDPNLK (SEQ ID N.º 9),
LLEVGNTGTFGSTGS (SEQ ID N.º 10),
DLANPDNV (SEQ ID N.º 11), y
WNLPE (SEQ ID N.º 12).

Los inventores han aislado, en efecto, concretamente ulvano liasas de 30 kD o 46 kD que presentan estas secuencias en común en su secuencia respectiva. Aunque estas proteínas poseen fragmentos peptídicos comunes entre sí, sus secuencias no han sido descritas nunca en la técnica anterior. Estas secuencias de 30 o 46 kD son activas para degradar los ulvanos mediante despolimerización de acuerdo con la presente invención. También se han extraído como se indica en los ejemplos a continuación.

Una de estas secuencias es la secuencia SEQ ID N.º 1 de 30 kD. La presente describe, por lo tanto, también esta secuencia. Esta secuencia es la parte catalítica de una ulvano liasa aislada por los inventores y de 46 kD (SEQ ID N.º 4). Esta ulvano liasa se representa en la figura 2 adjunta.

La secuencia ID n.º 1 puede comprender, por lo tanto, en su extremo C-terminal, la secuencia SEQ ID N.º 2 de la lista de secuencias adjunta.

De acuerdo con la invención, estas ulvano liasas, sea cual sea su secuencia, pueden comprender además, en su extremo N-terminal, una secuencia señal o secuencia de dirección. Esta secuencia señal puede ser una de las secuencias señal conocidas por el experto en la materia para que la proteína, cuando es sintetizada en una célula huésped, sea dirigida hacia un orgánulo o una zona particular de la célula huésped. Puede tratarse, por ejemplo, de una secuencia señal encontrada en los sitios especializados en la predicción de péptidos señal, por ejemplo, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> [2] o también http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html [3]. Pude tratarse, por ejemplo, de la secuencia SEQ ID N.º 3 de la lista de secuencias adjunta. Esta secuencia señal puede escindirse después de la síntesis de la proteína o no. Los procedimientos de escisión conocidos por el experto en la materia pueden utilizarse, por ejemplo, aquellos que implican proteasas específicas de un sitio de escisión. Se selecciona entonces una secuencia señal que presente dicho sitio. La presente describe ácidos nucleicos que codifican las ulvano liasas, concretamente la proteína SEQ ID N.º 1. Puede tratarse, por ejemplo, de un ácido nucleico que comprende o está constituido por la secuencia SEQ ID N.º 5 de la lista de secuencias adjunta.

La presente describe también un ácido nucleico que codifica la proteína de secuencia SEQ ID N.º 2 de la lista de secuencias adjunta. Puede tratarse, por ejemplo, de la secuencia SEQ ID N.º 6 de la lista de secuencias adjunta.

La presente describe también un ácido nucleico que codifica la proteína de secuencia SEQ ID N.º 3 de la lista de secuencias adjunta. Puede tratarse, por ejemplo, de la secuencia SEQ ID N.º 7 de la lista de secuencias adjunta.

La presente invención se refiere, también, a un ácido nucleico que codifica la proteína de secuencia SEQ ID N.º 4 de la lista de secuencias adjunta. Puede tratarse, por ejemplo, de la secuencia SEQ ID N.º 8 de la lista de secuencias adjunta.

Estas secuencias de ácidos nucleicos o genes de la presente invención son los primeros representantes de una nueva familia de genes que codifican polisacárido-liasas y representan también los primeros genes de enzimas conformes a la presente invención de degradación del ulvano.

La presente invención se refiere, también, a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una de las ulvano liasas de la presente invención: un ácido nucleico de secuencias SEQ ID N.º 8. El vector puede ser uno de los vectores conocidos por el experto en la materia para fabricar proteínas mediante recombinación genética. Se selecciona en general concretamente en función del huésped celular seleccionado. El vector puede seleccionarse, por ejemplo, entre los vectores enumerados en el catálogo http://www.promega.com/vectors/mammalian_express_vectors.htm [4] o http://www.qiagen.com/overview/qiagenes.aspx?gaw=PROTQIAGENes080_7&gkw=mammalian+expression [5], o también [http://www.scbt.com/chap_exp_vectors.php?type=pCruzTM%20Expressio n%20Vectors](http://www.scbt.com/chap_exp_vectors.php?type=pCruzTM%20Expressio%20n%20Vectors) [6]. Puede tratarse por ejemplo del vector de expresión descrito en el documento WO 83/004261 [7].

Los ácidos nucleicos de la presente invención o los vectores de la presente invención son utilizables concretamente para la fabricación por recombinación genética de las ulvano liasas de la presente invención. También, la presente invención se refiere, además, a una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención.

La célula huésped o huésped celular puede ser cualquier huésped apropiado para la fabricación de las ulvano liasas de la presente invención a partir de los ácidos nucleicos o de los vectores de la invención. Puede tratarse por ejemplo de *E. coli*, de *Pischia pastoris*, de *Saccharomyces cerevisiae*, de células de insectos, por ejemplo un sistemas de células de insectos-baculovirus (por ejemplo células de insecto SF9 que utilizan un sistema de expresión de baculovirus), de mamíferos.

También, la presente invención se refiere, también, a un procedimiento de fabricación de una ulvano liasa de acuerdo con la invención mediante recombinación genética utilizando un ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención. Los procedimientos de recombinación genética conocidos por el experto en la materia son utilizables, el origen marino o terrestre no influye en la posibilidad de recombinación y de expresión heteróloga.

Los inventores de la presente son, además, los primeros en haber aislado un microorganismo, nombrado por ellos 01-PN-2010, que produce las ulvano liasas de la presente invención. Se trata de una bacteria marina. Esta bacteria marina se encuentra, por ejemplo, en las heces de *Aplysia punctata* (*Mollusca, Gastropoda*). Los inventores depositaron esta bacteria de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de los microorganismos con fines del procedimiento en materia de patentes en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia. El número de depósito de esta cepa en la CNCM es I-4324.

Los inventores purificaron, a partir de este microorganismo, las dos ulvano liasas de 30 kD y 46 kD descritas en la presente.

También, la presente invención se refiere, también, al microorganismo depositado con el número I-4324 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia.

5 Este microorganismo puede utilizarse, por lo tanto, concretamente para la fabricación de ulvano liasas. La presente describe, por lo tanto, también un procedimiento de fabricación de ulvano liasas que comprenden el cultivo del microorganismo depositado con el número I-4324 en la CNCM en Francia.

10 Este cultivo se realiza, preferentemente, en un medio de cultivo que permite el crecimiento de este microorganismo marino. Puede tratarse, por ejemplo, de medio de cultivo líquido ZoBell, como se describe en el documento ZoBell, CE 1941 Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes, J Mar Res 4, 41-75 [8]. Condiciones de cultivo utilizables para la implementación de la presente invención también se describen en este documento. El pH de cultivo está comprendido preferentemente entre 7 y 9, preferentemente pH 8. La temperatura de cultivo está comprendida, preferentemente, entre 15 y 30 °C, preferentemente 25 °C. El cultivo se realiza
15 preferentemente con una concentración de NaCl de 20 a 30 g.l⁻¹, preferentemente de 25 g.l⁻¹.

Este procedimiento de fabricación de las ulvano liasas utilizando el microorganismo de la invención o cualquier otra célula huésped transformada para una fabricación mediante recombinación genética de acuerdo con la presente invención, puede comprender, además, una etapa de recuperación de las ulvano liasas. Esta etapa de recuperación o de aislamiento puede realizarse mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia. Puede tratarse, por ejemplo, de una técnica seleccionada entre una electroforesis, un tamizado molecular, una ultracentrifugación, una precipitación diferencial, por ejemplo con sulfato de amonio, por ultrafiltración, filtración sobre membrana o sobre gel, intercambio iónico, elución sobre hidroxiapatita, separación por interacciones hidrófobas, o cualquier otro medio conocido. Un ejemplo de procedimiento de aislamiento de estas ulvano liasas utilizables para la implementación de
20 la presente invención se describe a continuación.

El microorganismo mencionado anteriormente o cualquier otra célula huésped transformada para una fabricación mediante recombinación genética de acuerdo con la presente invención también puede utilizarse directamente para degradar ulvanos, en su medio natural o en cultivo. Cuando se trata de un cultivo, puede tratarse de un sistema discontinuo o continuo. Se puede utilizar, por ejemplo, un reactor de cultivo que contiene un medio de cultivo apropiado para el desarrollo del microorganismo.

La presente invención se refiere, por lo tanto, también a un procedimiento de degradación de ulvanos que comprende una etapa de puesta en contacto de los ulvanos con una ulvano liasa de acuerdo con la invención o con una célula huésped de acuerdo con la invención o con el microorganismo depositado con el número I-4324 en la CNCM en Francia, en las condiciones que permitan la degradación de los ulvanos por digestión enzimática por dicha ulvano liasa o dicha célula huésped transformada o dicho microorganismo depositado con el número I-4324 en la CNCM en Francia.

40 Las condiciones que permiten la degradación de los ulvanos, cuando se utiliza una célula huésped o microorganismo, son las expuestas anteriormente, respectivamente para la célula huésped o para el microorganismo.

Para la digestión enzimática, la determinación de las constantes de Michaelis Menten (Km y Vmax) permite fácilmente al experto en la materia encontrar las condiciones óptimas de concentración de la ulvano liasa utilizada y de concentración de los ulvanos para la degradación de los ulvanos en el medio en el que éstas se encuentran o en el medio en el que ha sido colocadas. El pH también puede estar comprendido preferentemente entre 7 y 8, preferentemente entre 9 y 9,5. Se trata, en efecto, de la gama de pH óptima. La temperatura (óptima) está preferentemente comprendida entre 30 °C y 40 °C. La fuerza iónica superior a NaCl 300 mM para la proteína de 46 kD y sin sal con la proteína de 30 kD, en otro modo, la fuerza iónica óptima es de NaCl 300 mM para la proteína de 46 kD y NaCl 100 mM para la proteína de 30 kD.

La invención permite ventajosamente movilizar el enorme recurso de algas actualmente no aprovechado, concretamente de algas verdes. La invención permite, además, favorecer la biodegradación de las algas, concretamente de las algas verdes, producir moléculas originales, que son fragmentos de ulvanos u oligoulvanos, por ejemplo oligosacáridos, por ejemplo también hidrocoloides, y ofrecer una fuente nueva de monosacáridos raros para aplicaciones cosméticas, agroalimentarias y medicamentos o formulaciones farmacéuticas y parafarmacéuticas.

60 Los productos de degradación de los ulvanos dan acceso a nuevos productos que pueden ser activos alimentarios, cosméticos, farmacéuticos y parafarmacéuticos utilizables en los campos agroalimentario, cosmético, farmacéutico y parafarmacéutico. Estos nuevos productos también pueden ser productos no activos pero que presentan una neutralidad y/o una estabilidad que es muy interesante para una utilización en cada uno de estos campos.

La utilización de las ulvano liasas de la presente invención da acceso, además, a monosacáridos raros utilizables como sintones en glucoquímica. La degradación del ulvano con las ulvano liasas combinadas con otras enzimas puede dar acceso al ácido idurónico (azúcar raro) utilizado para la síntesis de los glucosaminoglucanos de síntesis.

- 5 La presente invención abre también nuevas perspectivas de utilización de estas algas para aplicaciones en bioenergía y en química. La producción de fragmentos oligosacáridicos puede dar moléculas de base para la fabricación de otras moléculas. La despolimerización del ulvano debería facilitar la fermentación por microorganismos que conduce a la producción de metano, por ejemplo.
- 10 Otras características y ventajas aparecerán también al experto en la materia con la lectura de los ejemplos a continuación, dados a título ilustrativo y no limitante, en referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- 15 – La figura 1 es un gel de electroforesis de las proteínas ulvanolíticas de 30 kD (Gel A) y de 46 kD (Gel B). Las flechas indican las bandas que han sido escindidas y a continuación utilizadas para la secuenciación de los péptidos mediante espectrometría de masa.
- La figura 2 representa la secuencia proteica de ulvano liasa de 46 kD (SEQ ID N.º 4) de la presente invención con, en negrita, el péptido o la secuencia señal (SEQ ID N.º 3). En texto normal, el módulo catalítico, determinado por espectrometría de masa, SEQ ID N.º 1. La parte de la secuencia proteica no catalítica (SEQ ID N.º 2) de la proteína de 46 kD está subrayada.
- 20 – La figura 3 representa la secuencia del gen que codifica la proteína ulvano liasa de 46 kD. En negrita el gen que codifica el péptido o la secuencia señal (SEQ ID N.º 7). En texto normal, el gen SEQ ID N.º 5 que codifica el módulo catalítico de SEQ ID N.º 1, determinado por espectrometría de masa. Subrayada, la secuencia SEQ ID N.º 6 que codifica la parte no catalítica de la proteína de 46 kD (SEQ ID N.º 2) presente en el péptido de 46 kD.
- 25 – La figura 4 representa los resultados obtenidos de experimentos de cromatografía de intercambio iónico llevados a cabo antes o después de la incubación de un disacárido (gráfico A) o de un tetrasacárido (gráfico B) con la ulvano liasa de la presente invención. En estos gráficos, el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos (min) y el eje de ordenadas representa la conductimetría en nano-Culombios (nC).
- 30 – La figura 5 es una fotografía que representa placas de Petri con ulvanos marcados con una solución acuosa de rojo de rutenio al 0,05 % que muestra la degradación enzimática de los ulvanos por la ulvano liasa purificada de 30 kD (A), 46 kD (B) y el módulo catalítico recombinante (C). Un extracto que comprende bacterias *E. coli* desprovistas de plásmido de expresión también se depositó sobre el agar como control (D).
- La figura 6 representa los resultados obtenidos de experimentos de cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico de oligosacáridos purificados. (A) Δ -R3S no ha sido degradado por la ulvano liasa. (B) El tetrasacárido Δ -R3S-Glc-R3S se convirtió únicamente en Δ -R3S después de la incubación con la ulvano liasa. (C) El tetrasacárido Δ -R3S-Idu-R3S se convirtió únicamente en Δ -R3S después de la incubación con la ulvano liasa como se observa también en (B). En estos gráficos, el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos (min) y el eje de ordenadas representa la conductimetría en micro Siemens (μ S).
- 40

Ejemplos

Ejemplo 1: identificación del microorganismo de la presente invención

- 45 Varios individuos de *Aplysia punctata* (Mollusca, Gastropoda) se alimentaron con algas verdes que pertenecían al género *Ulva* (*Ulva* sp.), en particular *Ulva armoricana*. Las heces de los moluscos se recogieron y a continuación se congelaron para almacenamiento a -80 °C.

- 50 Una fracción de las heces se recogió y sirvió de inóculo en un medio de cultivo POPSO. En particular, esta fracción de heces se incubó con agitación, rotación a 200 rpm, en una incubadora que controla temperatura y rotación a 20 °C durante 72 horas en 5 ml de medio de cultivo POPSO (ácido piperazin-N,N'-bis[2-hidroxiopropano-3-sulfónico]) cuya composición es la siguiente:

- 55 – 25 mM del tampón POPSO pH 7,0,
 – NaCl 50 mM,
 – 0,4 g de ácido casamino,
 – 3 g de ulvano
 – 1 l de Agua de mar.

- 60 El ulvano utilizado en este caso y en los ejemplos a continuación se preparó mediante el procedimiento descrito en el documento Lahaye M. et al., Procédé d'extraction des ulvanes, (1996) Hydrobiologia, 326/327, 473 [9].

- 65 Otra fracción de las heces se incubó con agitación durante 72 h en 5 ml de medio de cultivo ZoBell 2216E (ZoBell, 1941) (ver ZoBell et al [8]). El medio ZoBell utilizado comprende los siguientes elementos (para 1 l de medio ZoBell): 5 g de bacto triptona, 1 g de extracto de levadura, 200 ml de agua destilada y 800 ml de agua de mar.

Cada uno de los cultivos líquidos se extendió a continuación sobre placas de agar que contenían medio de cultivo Zobell enriquecido en ulvano o "placas de agar-Zobell-ulvano". Estos medios ZoBell solidificados comprendían además de la composición anterior, el 1,5 % en peso de agar (15 g) y el 0,4 % en peso de ulvano. Las placas de ZoBell-agar se mantuvieron a 20 °C durante una semana.

5 Después de una semana de cultivo a 37 °C, aparecieron colonias que poseen características fenotípicas muy diferentes (color, tamaño, forma, etc.). Estas colonias se aislaron y resembraron varias veces en placas de agar-Zobell-ulvano, con, cada vez, un cultivo durante un periodo que permite ver las colonias a una temperatura de 20 °C. Se aislaron una veintena de cepas.

10 Todas las cepas aisladas se cultivaron durante 24 horas a 20 °C en medio de cultivo líquido Zobell enriquecido con el 0,4 % en peso de ulvano. Después de la centrifugación a 1000 x g, los sedimentos bacterianos se lisaron con ayuda de una prensa de French o con un tampón de lisis química y a continuación se centrifugaron a 1000 x g.

15 Los sobrenadantes de cultivos bacterianos y los sobrenadantes de los lisados bacterianos se examinaron por separado después de haber sido incubados en presencia de ulvano. Para ello, 50 µl de sobrenadante de cultivo bacteriano o 5 µl de lisado bacteriano se añadieron cada vez a 1 ml de medio de reacción que comprendía, en % en peso: 1 % de ulvano, NaCl 200 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 7,7.

20 La formación de doble enlace producida por las actividades de las ulvano liasas eventualmente presentes en los extractos fue seguida mediante espectrofotometría a 235 nm y la despolimerización del polisacárido se observó mediante electroforesis (C-PAGE) y por cromatografía de filtración de gel.

25 Cuatro de las veinte cepas aisladas presentaban una muy fuerte actividad ulvanolítica en los lisados bacterianos y los sobrenadante de cultivo.

La cepa más activa se referenció con el nombre 01-PN-2010 y a continuación se utilizó para la purificación de las ulvano liasas (ejemplos 2 y 3). Esta cepa se depositó en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia, con el número I-4324.

30 Ejemplo 2: búsqueda de las condiciones óptimas de cultivo de la cepa 01-PN-2010 de la presente invención y caracterización de la cepa

35 Diferentes cultivos de la cepa 01-PN-2010 se realizaron en un medio ZoBell 2216E, como en el ejemplo 1, a temperaturas de 4, 10, 20, 30, 37 y 42 °C durante 24 h. El crecimiento de 01-PN-2010 se observó mediante medición de la densidad óptica a 600 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu (marca comercial). Se observa un crecimiento de aproximadamente 4 °C a 35 °C, el óptimo de crecimiento está entre 20 y 30, y más bien alrededor de 25 °C.

40 El pH óptimo de cultivo se determinó a 20 °C en medio ZoBell añadiendo diferentes tampones:

- 20 mM de tampón MES para los pH 5,5; 6 y 6,5;
- 20 mM de tampón MOPS para pH 7;
- 45 – 20 mM de tampón HEPES para pH 7,5
- 20 mM de tampón TRIS-HCl para pH 8 y 8,5;
- 50 – 20 mM de tampón CHES para pH 9; 9,5 y 10.

Un crecimiento de 01-PN-2010 se observó entre pH 6,5 y 9 después de 3 días de incubación, con un óptimo de crecimiento a pH 7,5 a 8.

55 El efecto de NaCl sobre el crecimiento también se ensayó en medio ZoBell, a 20 °C y pH 8, con diferentes concentraciones de NaCl: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10, 25, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 y 80 g.l⁻¹. Después de 2 días de incubación, se observó un crecimiento en los medios ZoBell que comprenden de 2,0 a 65 g.l⁻¹ de NaCl, con un óptimo que se sitúa alrededor de 25 g.l⁻¹ (2,5 % en peso/volumen).

60 En las condiciones óptimas identificadas siguientes:

- temperatura de cultivo de 15 a 30 °C, preferentemente 15 a 25 °C, preferentemente 25 °C;
- pH entre 7 y 10, entre 7 y 9, preferentemente pH 8;
- de 20 a 30 g.l⁻¹ de NaCl, preferentemente 25 g.l⁻¹ de NaCl, el tiempo de duplicación de la cepa es de 3 horas.

65

Las colonias en un medio ZoBell 2216E Agar en placa de Petri son circulares, brillantes, naranjas, con un diámetro de 2 a 3 mm después de 5 días de incubación a 20 °C. El cultivo de la cepa en medio ZoBell-ulvano en placa de Petri durante 24 horas a 20 °C provoca la formación de un agujero que resulta de la hidrólisis del ulvano por la cepa.

5 Ejemplo 3: purificación de una ulvano liasa de acuerdo con la invención de 30 kD

La purificación se realizó a partir de un cultivo de 1 l de medio de Zobell (ver anteriormente para la composición) con el 0,4 % en peso de ulvano inoculado con 50 ml de un cultivo fresco de 01-PN-2010 que posee una densidad óptica a 600 nm.

10 El cultivo se llevó a cabo en Erlenmeyer y se mantuvo a 20 °C durante 96 horas con una agitación de 230 rpm (aparato, ver anteriormente). Durante todo el crecimiento bacteriano, la actividad ulvanolítica fue seguida por espectrometría a 235 nm.

15 Las bacterias se eliminaron del medio de cultivo mediante centrifugación a 7500 x g, 30 min a 10 °C. El sobrenadante se concentró hasta 120 ml mediante ultrafiltración con flujo tangencial sobre un filtro de 10 kD (Prep/Scale (marca comercial)-TFF, Milipore).

20 Una fracción de las proteínas se precipitó mediante adición de (NH₄)₂SO₄ 1 M en pequeñas cantidades con agitación suave de la solución mantenida en el hielo.

El precipitado se eliminó después de centrifugación a 20.000 x g a 10 °C y el sobrenadante que poseía la actividad ulvanolítica se utilizó para el resto de la purificación.

25 La totalidad del sobrenadante se inyectó en una columna HiTrap fenil-sefarosa high sub (1 ml; GE Healthcare) equilibrada con tampón A [Tris-HCl 20 mM pH 7,5, (NH₄)₂SO₄ 1 M] a un caudal de 1 ml min⁻¹ a temperatura ambiente, en este caso 22 °C. El gel se lavó con 2 volúmenes de columna de tampón A.

30 La elución de las proteínas se realizó aplicando un gradiente lineal decreciente de 1 M a 0 M de (NH₄)₂SO₄ [tampón A sin (NH₄)₂SO₄ respectivamente] sobre 20 volúmenes de columna.

35 Las fracciones activas (15 ml) se reunieron y a continuación se desalaron en una columna de desalado HiPrep (2,6 x 30cm; GE Healthcare) equilibrada en tampón B [Tris-HCl 20 mM, pH 8,0]. El caudal de carga y de elución era de 3 ml min⁻¹.

La muestra desalada se cargó en una columna HiTrap Q FF (1 ml; GE Healthcare) equilibrada con tampón B. El gel se lavó con 2 volúmenes de columna de tampón B antes de la elución con un gradiente lineal de NaCl en tampón B de 0 M a 1 M en 20 volúmenes de columna.

40 Las fracciones activas se reunieron y se cargaron en una columna HiTrap heparina HP (1 ml; GE Healthcare) equilibrada con tampón C [tampón de fosfato 10 mM, pH 7,0] a un caudal de 1 ml min⁻¹.

45 El gel se lavó con 2 volúmenes de columna de tampón C antes de la elución con un gradiente lineal de NaCl en tampón C de 0 M a 1 M en 20 volúmenes de columna.

Las fracciones activas (5 ml) se reunieron y se cargaron en una columna de Superdex 75 HiPrep (1,6 x 60 cm; GE Healthcare) equilibrada con el tampón B con NaCl 100 mM.

50 Las proteínas se eluyeron con un gradiente isocrático con el mismo tampón a 1 ml min⁻¹.

Los inventores aislaron de este modo una proteína de 30 kD. Esta proteína es una ulvano liasa activa. Los inventores observaron una pequeña contaminación con otras dos proteínas menos abundantes y de pesos moleculares y próximos.

55 La proteína mayoritaria de 30 kD se digirió con tripsina, a continuación los péptidos obtenidos se analizaron mediante espectrometría de masa en la plataforma RIO "Biopolymers" localizada en el INRA de Nantes. Los resultados del análisis y de secuenciación se presentan en la tabla 1 del ejemplo 5 a continuación.

60 Ejemplo 4: purificación de otra ulvano liasa de acuerdo con la invención

La purificación de esta otra ulvano liasa se realizó a partir de un cultivo de 01-PN-2010 en fermentador de 5 l en el medio de ZoBell descrito anteriormente con el 0,4 % en peso de ulvano, a 25 °C y con un pH mantenido a pH 7,8 durante 48 horas.

65 Las bacterias se eliminaron mediante centrifugación a 8000 g, 1 h a 10 °C. El sobrenadante se concentró hasta 220 ml mediante ultrafiltración tangencial en el sistema milipore (Prep/Scale (marca comercial)-TFF) con un filtro de 10

kD. Como anteriormente, las proteínas se precipitaron mediante adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M.

El sedimento se eliminó después de centrifugación a 20.000 g, 30 min a 10 °C.

5 30 ml de resina fenilsefarosa 6 high sub equilibrada con tampón B con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M se añadieron al sobrenadante y se mantuvieron durante 30 min con agitación suave. La resina se separó del medio por filtración en vidrio fritado. La resina se lavó a continuación con dos volúmenes de 75 ml de tampón B con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M y la elución se efectuó con tampón B en alícuotas de 25 ml en el vidrio fritado.

10 El resto de la purificación se llevó a cabo de una manera similar a para la proteína de 30 kD en el ejemplo anterior. Las fracciones activas (100 ml) se cargaron en una columna HiTrap fenilsefarosa high sub (1 ml; GE Healthcare) equilibrada en tampón B con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M a un caudal de 1 ml min⁻¹ a temperatura ambiente, en este caso 22 o 20 °C.

15 Las fracciones activas (30 ml) se mezclaron y se desalaron en una columna de desalado HiPrep (2,6 x 30cm; GE Healthcare) equilibrada en tampón D [Bis-Tris 20mM pH 6,0].

20 La muestra desalada se cargó en una columna HiTrap DEAE (1 ml; GE Healthcare) equilibrada con tampón D a 1 ml min⁻¹. El gel se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón D antes de la elución con un gradiente lineal de NaCl de hasta 1 M en tampón D.

25 Las fracciones activas se mezclaron (7 ml) y se diluyeron a 50 ml en tampón B antes de la carga en una columna HiTrap Q FF (1 ml; GE Healthcare) equilibrada con tampón B. El gel se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón B antes de la elución con un gradiente lineal de NaCl de hasta 1 M en tampón B.

Las fracciones activas (5 ml) se colocaron y se inyectaron en común en una columna Superdex 75 HiPrep (1,6 x 60 cm; GE Healthcare) equilibrada con tampón B con NaCl 100 mM.

30 Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente isocrático con el mismo tampón a 1 ml min⁻¹.

Las fracciones activas (15 ml) se mezclaron y dializaron durante la noche frente a tampón C.

35 La muestra desalada se cargó en una columna HiTrap heparina HP rellena previamente (1 ml; GE Healthcare) equilibrada con Tampón C [tampón de fosfato 10 mM pH 7,0] a un caudal de 0,5 ml min⁻¹. El gel se lavó con 2 volúmenes de columna de tampón C antes de la elución con un gradiente lineal de NaCl en tampón C de 0 M a 1 M en 20 volúmenes de columna.

40 En cada etapa de la purificación, las fracciones activas se analizaron mediante SDS-PAGE siguiendo la técnica descrita en el documento Laemmli UK and Favre M 1973 Links maturation of the head of bacteriophage T4.I. DNA packaging events. J Mol Biol 80: 575-599 [10].

45 La cuantificación de proteínas se ejecutó de acuerdo con la técnica descrita en el documento Bradford MM 1976; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254 [11] utilizando el reactivo Biorad [Biorad protein assay (marca comercial)] con albúmina de suero de ternero como patrón.

50 La actividad de ulvano liasa extraída se analizó mediante un método espectrofotométrico: 25-50 µl de extracto se añadieron a 1 ml de medio de reacción [Tris-HCl 20 mM pH 7 u 8,5, NaCl 200 mM y 1% en peso de ulvano]. El aumento de la absorbancia a 235 nanómetros se siguió durante 5 mn.

Para la identificación de las fracciones activas, los inventores utilizaron un método de detección en placa de Petri siguiendo el método descrito en el documento Gacesa P and Wusteman FS 1990 Plate assay for simultaneous detection of alginate lyases and determination of substrate specificity. Appl and Environ Microbiol 56: 2265-2267 [12].

55 Alícuotas de 2 microlitros de las fracciones de proteínas se depositan sobre geles de agarosa (1% en peso de agarosa, 0,1% en peso de ulvanos, Tris 20 mM-pH 7,7 o 8,5, NaCl 200 mM). La placa de Petri se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente, en este caso 20 °C, y la presencia de actividad enzimática se reveló mediante la adición de una solución de rojo de rutenio (0,5 % en peso en agua) durante 10 minutos o durante 10 a 30 minutos. Las fracciones activas se identifican mediante manchas claras (no coloreadas) sobre fondo rosa.

60 Las proteínas purificadas migraron en gel de electroforesis y a continuación se tiñeron mediante azul coloidal. Las bandas de proteína se escindieron de los geles de SDS-PAGE y se analizaron mediante espectrometría de masa en la plataforma RIO "Biopolymers" INRA, en Nantes.

65 Los inventores aislaron de este modo una proteína de 46 kD de secuencia SEQ ID N.º 4.

Las secuencias de los péptidos obtenidos después de la incubación con tripsina no tenían ninguna homología significativa con secuencias de la técnica anterior en el banco TrEMBL a pesar del tamaño importante de los fragmentos peptídicos secuenciados.

5 Las proteínas, llamadas proteínas ulvanolíticas, de 30 kD aislada en el ejemplo 3 y de 46 kD aislada en el presente ejemplo se purificaron en gel de electroforesis como se representa en la figura 1 adjunta: gel de electroforesis de la proteína de 30kD (Gel A) y de la proteína 46 kD (Gel B). Las flechas indican las bandas que se escindieron y a continuación se utilizaron para la secuenciación de los péptidos mediante espectrometría de masa.

10 Tabla 1: Secuencias peptídicas obtenidas a partir de las proteínas ulvanolíticas de 30 kD y 46 kD mediante secuenciación de novo

Masa molecular			
30 kD		46 kD	
Secuencias	SEQ ID N.º	Secuencias	SEQ ID N.º
PNDPNLK	9	PNDPNLK	9
BILEVGNTGTFGSTGSA	13	ILEVGNTGTFGSTGSYLMQAK	30
DLANPDNV	11	DLANPDNV GTVDDR	31
ALLGGQVFNWNIPES	14	QEMALLMQEVDWNIPE	32
BEQLNFR	15	-----ADLYR	33
LELLDLELE	16	WDNSTLPAADLYR	34
TGVGSYAR	17	ADLYR	35
BPVYG-NQVQVSFDLWR	18	YHDTNNMLTHSANLDDR	36
GGGGSNDPALCLYLAR	19	LYENGELVDEFL	37
ACPSSGVFQ	20		
LLSGWG	21		
BVYDNTLV	22		
FGVTGPPT	23		
DLLGNTLD	24		
BDTDLPNPR	25		
ATGAG	26		
BSCYANYSESSLGK	27		
BDDPNNPGQTLHYAWK	28		
BFWGLYNLTD	29		

15 Las secuencias en **negrita** corresponden a las secuencias comunes a las ulvano liasas de 30 y 46 kD de la presente invención. Los cuatro primeros péptidos son comunes para las dos proteínas. Estos datos confrontados con el banco TrEMBL no permitieron identificar una secuencia homóloga que comprenda estas cuatro secuencias en una sola proteína.

20 Las secuencias subrayadas se emplearon para la construcción de los cebadores degenerados utilizados en el ejemplo siguiente.

Ejemplo 5: identificación de un gen codificante

5.1) Cebadores degenerados

25 Se sintetizaron seis cebadores degenerados sobre la base de las secuencias peptídicas comunes a las proteínas de 30 y 46 kD obtenidas a partir de la espectrometría de masa en las dos direcciones (Forward (Directo): F y Reverse (Inverso): R; tabla 2).

30 Se realizó una amplificación por PCR con todas las combinaciones posibles de los cebadores en 75 ng de ADN genómico de 01-PN-2010 en medios de reacción de 25 µl que contenían tampón GoTaq PCR 1x, MgCl₂ 1 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 2 µM de los cebadores Forward y Reverse, y 1,25 U de GoTaq (Promega). El programa de amplificación era de 94 °C durante 2 minutos, treinta y cinco ciclos de: 94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min 30 s seguido por una etapa final a 72 °C durante 7 minutos. A continuación, las muestras se mantuvieron a 4 °C antes de la secuenciación.

35 De esta manera, los inventores obtuvieron un fragmento de 700 pb del gen de ulvano liasa

5.2) "Tail PCR"

40 El método de TAIL-PCR descrito en el documento Liu YG and Whittier RF 1995 Thermal Asymmetric Interlaced PCR: Automatable Amplification and Sequencing of Insert End Fragments from P1 and YAC Clones for Chromosome walking. Genomics 25: 674-681 [13] se realizó para obtener la secuencia de los extremos del gen de ulvano liasa.

5 Los cebadores “específicos” son cebadores degenerados concebidos basándose en los fragmentos de secuencia del gen conocido (Tabla 2). Cinco cebadores degenerados “arbitrarios” diferentes se seleccionaron entre los determinados en la bibliografía (tabla 2 en el documento Liu y Whittier et al [6], y en el documento Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T and Whittier RF 1995 Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J. 8: 457-463 [14]).

Los programas de amplificación eran diferentes para las diferentes reacciones de TAIL PCR (Tabla 3) y se basan en los programas de Liu et al 1995 [14] pero adaptados a las máquinas de PCR disponibles en el laboratorio.

Tabla 2: cebadores utilizados para identificar el gen de ulvano liasa (F: forward, R: reverse)

Cebador	SEQ ID N.º	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID N.º	T _m
Cebadores degenerados de ulvano liasa				
VGNTGTFG-F	64	GTN GGN AAY ACN GGN ACN TTY GG	38	52-64
PNDPNLK-F	9	CCN AAY GAY CCN AAY YTN AA	39	42-56
ANPDNVG-F	65	GCN AAY CCN GAY AAY GTN GG	40	48-60
TLPAADLY-F	66	ACN YTN CCN GCN GCN GAY YTN TA	41	50-66
GGQVFNW-F	67	GGN GGN CAR GTN TTY AAY TGG	42	49-60
GQTLHYAW-F	68	GGN CAR ACN YTN CAY TAY GCN TGG	43	52-66
VGNTGTFG-R	64	CCR AAN GTN CCN GTR TTN CCN AC	44	52-64
PNDPNLK-R	9	TTN ARR TTN GGR TCR TTN GG	45	42-56
ANPDNVG-R	65	CCN ACR TTR TCN GGR TTN GC	46	48-60
TLPAADLY-R	66	TAN ARR TCN GCN GGN ARN GT	47	50-66
GGQVFNW-R	67	CCA RTT RAA NAC YTG NCC NCC	48	49-60
GQTLHYAW-R	68	CCA NGC RTA RTG NAR NGT YTG NCC	49	52-66
Cebadores específico para TAIL PCR				
UL_133R	-	CTAG GTT GTA ATG TGT TAG GTG CAT CCC	50	60
UL_194R	-	GTG AAT CGC GCA TAA CTT CCC ACA CC	51	61
UL_285R	-	CC CGT GTG CTT ACC TTT GGC CTG C	52	63
UL_426F	-	GC AGC TGG AAG AAC CGA GGT CTT TC	53	61
UL_582F	-	CCG GAA CCA GAA CGA GGA AGA GAA TC	54	61
UL_643F	-	GGA GGA AGA GCA CAA ATG AGA TGG GC	55	61
AfterUL_1F	-	CAC GTA ATC TGG GTA GGT TTT TAT ATC ATG ATA CC	56	61
AfterUL_2F	-	GCT TCT GTA GGT GTG TAT CCT AAC CC	57	60
AfterUL_3F	-	GCT GGA CGT GTG TCT TCT TTG TAT TAC GC	58	62
Cebadores arbitrarios degenerados para TAIL PCR				
AD1	-	TGW GNA GWA NCA SAG A	59	38-43
AD2	-	AGW GNA GWA NCA WAG G	60	38-43
AD3	-	WGT GNA GWA NCA NAG A	61	38-43
AD4	-	NTC GAS TWT SGW GTT	62	36-39
AD5	-	NGT CGA SWG ANA WGA A	63	38-43
Cebadores arbitrarios para clonación en pFO4				
UL_BgIII_F	-	GGG GGG AGA TCT GCG CCT GAT GAG GAT ACA AAT TCT	69	-
UL_EcoRI_R	-	CCC CCC CAA TTG TTA TCC TGA CGT ACT TGC GAT AAT GCT	70	-

Tabla 3: Condiciones de amplificación utilizadas para Tail-PCR

Reacción	Número de ciclos	Temperaturas y periodos
Primaria	1	93 °C, 2 min
	5	94 °C, 1 min; 62 °C, 1 min; 72 °C, 2 min
	2	94 °C 1 min; reajustando en rampa hasta 25 °C durante 3 min; 25 °C, 3 min; reajustando en rampa hasta 72 °C durante 3 min; 72°C, 2 min
	15	94 °C, 30 s; 65 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 94 °C, 30 s; 65 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 94 °C, 30 s; 45 °C, 1 min; 72 °C, 2 min
Secundaria	1	72 °C, 7 min; 4 °C, ∞
	1	93 °C, 1 min
	13	94 °C, 30 s; 62 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 94 °C, 30 s; 62 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 94 °C, 30 s; 45 °C, 1 min; 72 °C, 2 min
Terciaria	1	72 °C, 7 min; 4 °C, ∞
	1	93 °C, 1 min
	20	94 °C, 30 s; 45 °C, 1 min; 72 °C, 2 min
	1	72 °C, 7 min; 4 °C, ∞

Ejemplo 6: Protocolo de digestión de ulvanos por las ulvano liasas de la presente invención

- 5 25 µl de una fracción de ulvano liasa pura con una concentración de 5,7 µg de proteína por ml se añadió a 1 ml de medio de reacción compuesto por NaCl (200 mM), ulvano (1 g L⁻¹) y Tris HCl (20 mM, pH 9,2) a 35 °C en una cubeta de cuarzo. La degradación del ulvano (o más bien la formación de doble enlace) se siguió mediante el aumento de la absorbancia a 235 nm.

10 Ejemplo 7: degradación de oligoulvanos por las ulvano liasas de la presente invención

La figura 4 representa los resultados obtenidos de experimentos de cromatografía de intercambio iónico llevados a cabo antes o después de la incubación de un disacárido (gráfico A) o de un tetrasacárido (gráfico B) con las ulvano liasas de la presente invención obtenidas en los ejemplos anteriores, en las mismas condiciones que el ejemplo anterior.

15 La degradación del tetrasacárido demuestra la actividad glucurónico liasa de la enzima. En estos gráficos, el eje de abscisas representa el tiempo de elución en minutos (min), y el eje de ordenadas representa conductimetría en nano-Culombios (nC).

20 Ejemplo 8: expresión heteróloga y degradación de oligoulvanos por las ulvano liasas de la presente invención

El módulo catalítico del gen de ulvano liasa identificado en el ejemplo 5 mencionado anteriormente se amplificó con cebadores específicos que permiten la incorporación de los sitios de restricción BglIII y EcoRI a los extremos 5' y 3' del fragmento, respectivamente (Tabla 2).

30 Condiciones estándar de PCR, a saber 1x tampón de PCR GoTaq, MgCl₂ 1 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 2 µM de los cebadores "sentido" forward y "anti-sentido" reverse, 1,25 U de GoTaq (Promega) y 15 ng de ADN genómico, se utilizaron con una temperatura de hibridación de 50 °C y 30 ciclos de polimerización. Los productos de PCR se purificaron a continuación, se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas, es decir BglIII y EcoRI y se subclonaron en el vector de expresión pFO4 modificado de pET15 (Novagen) para ser compatibles con las estrategias de ligamiento BamHII/EcoRI y BglIII/MfeI.

35 Los plásmidos recombinantes se utilizaron para transformar la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* preparada en el laboratorio de acuerdo con el protocolo de Cohen, SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* par R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 69: 2110-2114 [15]. Se cultivaron colonias transformadas en primer lugar 3 h a 37 °C en un medio de expresión a base de Luria-Bertani (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por l) con ampicilina y glucosa al 0,5 %. A continuación se añadió un volumen igual de medio Luria-Bertani frío con lactosa al 0,6 %, Hepes 20 mM pH 7,0 y 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y el cultivo se incubó a 20 °C durante 18 h.

45 Después de la centrifugación el sedimento bacteriano se suspendió en un tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 5 mM con un pH de 7,4. La lisis de células se realizó en una prensa de French y los residuos bacterianos se retiraron por centrifugación a 20.000 rpm. El sobrenadante se aplicó a una columna de Ni Sefarosa cargada con NiSO₄ 100 mM (GE Healthcare). Después del lavado, las proteínas fijadas se eluyeron mediante un gradiente lineal de imidazol de 5 mM a 500 mM. Las fracciones activas se agruparon y desalaron en una columna HiPrep 26/10 de desalado en equilibrio en Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

50 Las fracciones activas se identificaron mediante el ensayo en placa de Petri, descrito en el ejemplo 4.

La expresión heteróloga del módulo catalítico de ulvano liasa mostró una degradación de ulvanos en las placas de Petri, manchas claras en la figura 5, confirmando de este modo la función catalítica.

2. Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico (HPAEC)

La pureza de las fracciones de oligosacáridos y la cinética de degradación de oligosacáridos puros se analizó mediante HPAEC con un aparato de cromatografía Dionex ICS 3000 equipado con un bucle de inyección de 20 μ l, un sistema de inyección automática AS100XR (Thermo Separation Products) y con una columna de intercambio aniónico AS11 anion (4 mm x 250 mm, Dionex IonPac) asociada a una columna de guardia AG11 (4 mm x 50 mm, Dionex IonPac). El sistema se implementó en un modo conductividad utilizando un detector ED40 (Dionex) y un supresor Dionex ASRS ultra-4 mm con una corriente de 300 mA. Las fases móviles eran agua ultrapurificada y 290 mM de NaOH. La elución se realizó a un caudal de 0,5 ml min^{-1} con una bomba de gradiente GP40. El gradiente utilizado era 0 min, 3 % de B; 1,5 min 1 % de B; 4,1 min 5 % de B; 6,5 min 10 % de B; 10,0 min 18 % de B; 26 min 22 % B; 28 min 40 % de B; 30 min 100 % de B; 30,1 min 3 % de B; 37 min 3 % B. El programa Chromeleon-peak Net (Dionex) se utilizó para la adquisición de los datos y la transferencia. Los disacáridos y tetrasacáridos se incubaron con las ulvano liasas purificadas de la invención y se analizaron mediante HPAEC.

El disacárido Δ -R3S, es decir (ácido 4-desoxi-L-treo-hex-4-enopiranosidurónico unido en 4 al L-Rha-3-sulfato) Figura 6A y el tetrasacárido Δ -R3S-Xyl-R3S no fueron modificados por las enzimas y son productos finales. La mezcla de tetrasacáridos Δ -R3S-GlcA-R3S y Δ -R3S-IduA-R3S (70:30, 50:50 y 30:70, relaciones de GlcA:IduA) se convirtieron completamente en un único disacárido: Δ -R3S, mostrando que la ulvano liasa escindió el enlace glucosídico entre ramnosa sulfatada y el residuo glucurónico o idurónico. Las figuras 6 B y C representan los resultados obtenidos que muestran los picos de cada sacárido. La cinética de degradación de estas mezclas se siguió mediante HPAEC para poner de relieve las posibles diferencias de reconocimiento de los residuos glucurónico o idurónico.

Sin embargo, la velocidad de degradación de las mezclas de tetrasacáridos y la velocidad de producción del disacárido Δ -R3S eran independientes de la relación GlcA:IduA. Las velocidades de degradación de $0,18 \pm 0,05$ $\mu\text{M}/\text{min}$ y $0,08 \pm 0,02$ se observaron para las ulvano liasas de 30 kD y 46 kD. Las degradaciones se realizaron con concentraciones de tetrasacáridos 1,5 mM en 200 mM de carbonato de amonio a 30 °C.

Tal como se demostró en este ejemplo, las ulvano liasas de la invención o descritas permiten, por lo tanto, un corte a nivel del ácido glucurónico y también a nivel del ácido idurónico, demostrando que las ulvano liasas de la presente invención tienen una actividad diferente y superior a las de la técnica anterior.

Lista de referencias

[1] Marc Lahaye et Audrey Robic, Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 2007, Vol. 8, 1765-1774.

[2] <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>.

[3] http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html.

[4] http://www.promega.com/vectors/mammalian_express_vectors.htm.

[5] http://www.qiagen.com/overview/qiagenes.aspx?gaw=PROTQIAgene_s0807&gkw=mammalian+expression.

[6] http://www.scbt.com/chap_exp_vectors.php?type=pCruzTM%20Expression%20Vectors.

[7] WO 83/004261.

[8] ZoBell, CE 1941 Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes, *J Mar Res* 4, 41-75.

[9] Lahaye M., Bimalendu R., Baumberger S., Quernener B. and Axelos M., Procédé d'extraction des ulvanes, (1996) *Hydrobiologia*, 326/327, 473.

[10] Laemmli UK and Favre M 1973 Links maturation of the head of bacteriophage T4.I. DNA packaging events. *J Mol Biol* 80: 575-599.

[11] Bradford MM 1976; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

[12] Gacesa P and Wusteman FS 1990 Plate assay for simultaneous detection of alginate lyases and determination of substrate specificity. *Appl and Environ Microbiol* 56: 2265-2267.

[13] Liu YG and Whittier RF (1995), Thermal Asymmetric Interlaced PCR: Automatable Amplification and Sequencing of Insert End Fragments.

5 [14] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T and Whittier RF (1995), Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J. 8: 457-463.

[15] Cohen, SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 69: 2110-2114

10 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Centre d'Etude et de valorisation des Algues
Université Pierre et Marie Curie

15 <120> ULVANO LIASA, PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN Y UTILIZACIONES

<130> BIP206420FR00

20 <150> FR 1002588

<151> 18-062010

<160> 70

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

<211> 298

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> CNCM n° I-4324

<400> 1

ES 2 588 245 T3

Ala Pro Asp Glu Asp Thr Asn Ser Ser Ile Ala Cys Pro Ser Ser Gly
1 5 10 15

Val Phe Gln Asn Asn Thr Thr Arg Asp Val Asp Ile Ala Asn Pro Asp
20 25 30

Asn Val Gly Thr Val Asp Asp Arg Thr Cys Tyr Ala Asp Tyr Tyr Glu
35 40 45

Thr Ser Val Tyr Gly Glu Thr Trp Gly Ala Tyr Asn Ile Thr Phe Asn
50 55 60

Ser Asn His Trp Asp Ala Pro Asn Thr Leu Gln Pro Arg Ile Glu Arg
65 70 75 80

Ser Leu Ser Arg Ser Gln Glu Thr Gly Val Gly Ser Tyr Ala Arg Phe
85 90 95

Thr Gly Thr Leu Arg Ile Leu Glu Val Gly Asn Thr Gly Thr Phe Gly
100 105 110

Ser Thr Gly Ser Tyr Leu Met Gln Ala Lys Gly Lys His Thr Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Asn Asp Pro Ala Ile Cys Leu Tyr Leu Ala Arg Pro Val
130 135 140

Tyr Gly Pro Asp Ala Asn Gly Asn Gln Val Gln Val Ser Phe Asp Ile
145 150 155 160

Trp Arg Glu Gln Ile Asn Phe Arg Gly Gly Ser Gly Ala Ala Gly Arg
165 170 175

ES 2 588 245 T3

Thr Glu Val Phe Leu Arg Asn Val Leu Lys Asp Glu Ile Ile Asp Ile
 180 185 190

Glu Leu Glu Val Gly Phe Arg Gln Asp Pro Asn Asp Pro Asn Leu Lys
 195 200 205

Ile His Tyr Ser Asp Ala Ile Ile Gly Gly Gln Val Phe Asn Trp Asn
 210 215 220

Ile Pro Glu Pro Glu Arg Gly Arg Glu Ser Gly Ile Arg Tyr Gly Val
 225 230 235 240

Tyr Arg Val Lys Gly Gly Arg Ala Gln Met Arg Trp Ala Asn Thr Thr
 245 250 255

Tyr Gln Lys Val Glu Val Val Asp Asn Ser Thr Ile Pro Ala Ala Asp
 260 265 270

Ile Tyr Arg Ile Lys Asn Val Glu Thr Gly Glu Tyr Leu Thr Ser Ser
 275 280 285

Gly Ser Ser Ile Ile Ala Ser Thr Ser Gly
 290 295

<210> 2
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CNCM n° I-4324

10

<400> 2
 Thr Gly Ser Asp Lys Glu Trp Glu Ile Ile Ser Ala Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Tyr Val Asn Ile Asp Ser Gln Val Arg Gly Ile Ile Arg Phe Thr
 20 25 30

Gly Gly Ser Ser Asn Pro Gly Leu Val Ser Thr Asn Phe Ser Pro Pro
 35 40 45

Asn Thr Asp Thr Asp Lys Val Trp Thr Val Ile Asp Asn Asn Asp Gly
 50 55 60

Thr Val Ser Phe Glu Thr Arg Asn Leu Gly Arg Phe Leu Tyr His Asp
 65 70 75 80

Thr Asn Asn Met Ile Thr His Ser Ala Asn Ile Asp Asp Arg Ser Lys
 85 90 95

Trp Asn Leu Glu Ser Thr Thr Leu Ser Val Asp Ser Gln Gln Ile Ala

ES 2 588 245 T3

100

105

110

Ser Val Gly Val Tyr Pro Asn Pro Thr Val Asp Gly Phe Thr Ile Ser
115 120 125

Leu Asp Asn Ile Ser Ala Glu Lys Val Gln Ile Phe Asn Leu Leu Gly
130 135 140

Met Leu Val Tyr Glu Gln Lys Thr Asn Glu Ser Ser Ile His Ile Asp
145 150 155 160

Asn Met Asp Asn Phe Asp Ser Gly Met Tyr Ile Ile Ser Val Thr Ala
165 170 175

Asn Asp Asn Lys Val Tyr Gln Thr Lys Leu Ile Val Asn
180 185

5 <210> 3
<211> 47
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CNCM n° I-4324

<400> 3
Met Val Phe Phe Lys Asp Leu Phe Ile Phe Lys Ser Leu Ile Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Tyr Ser Gly His Met Lys Lys Lys Leu Leu Asn Tyr Leu Pro
20 25 30

Leu Phe Ala Leu Met Leu Phe Thr Val Ser Met Met Ala Gln Thr
35 40 45

15 <210> 4
<211> 534
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CNCM n° I-4324

<400> 4
Met Val Phe Phe Lys Asp Leu Phe Ile Phe Lys Ser Leu Ile Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Tyr Ser Gly His Met Lys Lys Lys Leu Leu Asn Tyr Leu Pro
20 25 30

Leu Phe Ala Leu Met Leu Phe Thr Val Ser Met Met Ala Gln Thr Ala
35 40 45

25 Pro Asp Glu Asp Thr Asn Ser Ser Ile Ala Cys Pro Ser Ser Gly Val
50 55 60

ES 2 588 245 T3

Phe Gln Asn Asn Thr Thr Arg Asp Val Asp Ile Ala Asn Pro Asp Asn
 65 70 75 80
 Val Gly Thr Val Asp Asp Arg Thr Cys Tyr Ala Asp Tyr Tyr Glu Thr
 85 90 95
 Ser Val Tyr Gly Glu Thr Trp Gly Ala Tyr Asn Ile Thr Phe Asn Ser
 100 105 110
 Asn His Trp Asp Ala Pro Asn Thr Leu Gln Pro Arg Ile Glu Arg Ser
 115 120 125
 Leu Ser Arg Ser Gln Glu Thr Gly Val Gly Ser Tyr Ala Arg Phe Thr
 130 135 140
 Gly Thr Leu Arg Ile Leu Glu Val Gly Asn Thr Gly Thr Phe Gly Ser
 145 150 155 160
 Thr Gly Ser Tyr Leu Met Gln Ala Lys Gly Lys His Thr Gly Gly Gly
 165 170 175
 Gly Ser Asn Asp Pro Ala Ile Cys Leu Tyr Leu Ala Arg Pro Val Tyr
 180 185 190
 Gly Pro Asp Ala Asn Gly Asn Gln Val Gln Val Ser Phe Asp Ile Trp
 195 200 205
 Arg Glu Gln Ile Asn Phe Arg Gly Gly Ser Gly Ala Ala Gly Arg Thr
 210 215 220
 Glu Val Phe Leu Arg Asn Val Leu Lys Asp Glu Ile Ile Asp Ile Glu
 225 230 235 240
 Leu Glu Val Gly Phe Arg Gln Asp Pro Asn Asp Pro Asn Leu Lys Ile
 245 250 255
 His Tyr Ser Asp Ala Ile Ile Gly Gly Gln Val Phe Asn Trp Asn Ile
 260 265 270
 Pro Glu Pro Glu Arg Gly Arg Glu Ser Gly Ile Arg Tyr Gly Val Tyr
 275 280 285
 Arg Val Lys Gly Gly Arg Ala Gln Met Arg Trp Ala Asn Thr Thr Tyr
 290 295 300
 Gln Lys Val Glu Val Val Asp Asn Ser Thr Ile Pro Ala Ala Asp Ile
 305 310 315 320
 Tyr Arg Ile Lys Asn Val Glu Thr Gly Glu Tyr Leu Thr Ser Ser Gly
 325 330 335

ES 2 588 245 T3

Ser Ser Ile Ile Ala Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Asp Lys Glu Trp
 340 345 350

Glu Ile Ile Ser Ala Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Val Asn Ile Asp Ser
 355 360 365

Gln Val Arg Gly Ile Ile Arg Phe Thr Gly Gly Ser Ser Asn Pro Gly
 370 375 380

Leu Val Ser Thr Asn Phe Ser Pro Pro Asn Thr Asp Thr Asp Lys Val
 385 390 395 400

Trp Thr Val Ile Asp Asn Asn Asp Gly Thr Val Ser Phe Glu Thr Arg
 405 410 415

Asn Leu Gly Arg Phe Leu Tyr His Asp Thr Asn Asn Met Ile Thr His
 420 425 430

Ser Ala Asn Ile Asp Asp Arg Ser Lys Trp Asn Leu Glu Ser Thr Thr
 435 440 445

Leu Ser Val Asp Ser Gln Gln Ile Ala Ser Val Gly Val Tyr Pro Asn
 450 455 460

Pro Thr Val Asp Gly Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ile Ser Ala Glu
 465 470 475 480

Lys Val Gln Ile Phe Asn Leu Leu Gly Met Leu Val Tyr Glu Gln Lys
 485 490 495

Thr Asn Glu Ser Ser Ile His Ile Asp Asn Met Asp Asn Phe Asp Ser
 500 505 510

Gly Met Tyr Ile Ile Ser Val Thr Ala Asn Asp Asn Lys Val Tyr Gln
 515 520 525

Thr Lys Leu Ile Val Asn
 530

<210> 5
 <211> 896
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> CNCM n° I-4324

10

<400> 5

ES 2 588 245 T3

gcgctgatg aggatacaaa ttctagtata gcttgtccta gctcaggtgt ttttcaaaat 60
aatacgacta gagatgtaga tatagccaat cctgataatg tgggtactgt tgatgataga 120
acctgttatg cagattatta tgaaactagt gtttatggag aaacttgggg agcatataac 180
ataaccttta attctaataca ttgggatgca cctaacacat tacaacctag aatagagcga 240
tcattatcaa ggtctcaaga aactgggtgtg ggaagttatg cgcgattcac tgggacattg 300
agaattcttg aagttggtaa taccggtact ttcggtagta ctggaagtta tctgatgcag 360
gccaaaggta agcacacggg cgggtgggtgga tcaaatgac cggcgatctg tttgtattta 420
gcaagaccag tttatggacc tgacgctaata ggtaatacaag tacaggtatc atttgatatt 480
tggagggaaac agatcaattt tagaggtgga tccggagcag ctggaagaac cgaggtcttt 540
cttagaaatg ttttaaaaga tgaaataatt gatatagaat tagaagtagg atttagacaa 600
gatcctaata atcctaattt aaaaatacac tattctgatg ctatcatagg tgggtcaagta 660
tttaattgga atattccgga accagaacga ggaagagaat ctggtatcag atatgggggtt 720
taccgtgtaa aaggaggaag agcacaaatg agatgggcaa atacgactta tcagaaagta 780
gaagttgtag ataatagtac tatccctgca gcagatattt acaggataaa aaatgtagag 840
actggagaat atttaacatc atcaggttca agcattatcg caagtacgtc aggaac 896

5 <210> 6
<211> 569
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CNCM n° I-4324

<400> 6
actggttcag ataaagaatg ggagataatc tcagctggat ctggctctag ctatgtcaat 60
atcgatagtc aagtttagagg aataataaga tttactgggt gatcgtcaaa tccaggatta 120
gtaagtacaa atttttcacc gccaaataca gatacagata aagtatggac tgttattgat 180
aataatgatg gaactgttag ttttgaaca cgtaatctgg gtaggttttt atatcatgat 240
accaataata tgataacaca ttcagctaata atagatgata gaagtaaatg gaatcttgaa 300
tccactactt taagtgttga tagtcagcaa attgcttctg taggtgtgta tcctaaccct 360
acggttgatg gctttacaat atccttagat aatattagt ctgagaaagt tcaaattttc 420
aaccttttag gaatgttgg atacgaacaa aagacaaatg agtcaagtat ccacatagat 480
aacatggata actttgattc aggtatgtat atcattagt ctaccgcaa tgataacaag 540
gtttatcaaa ccaagctcat tgtaaatta 569

15 <210> 7
<211> 143
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CNCM n° I-4324

<400> 7

ES 2 588 245 T3

atggtgtttt ttaaagattt attcatcttt aaatctttaa ttaaaggatc tttatattca 60
 ggacacatga aaaaaaatt attgaattat ttaccattgt ttgcattgat gctatttaca 120
 gtgtcaatga tggctcaaac agc 143

5 <210> 8
 <211> 1607
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CNCM n° I-4324

<400> 8
 atggtgtttt ttaaagattt attcatcttt aaatctttaa ttaaaggatc tttatattca 60
 ggacacatga aaaaaaatt attgaattat ttaccattgt ttgcattgat gctatttaca 120
 gtgtcaatga tggctcaaac agcgcgcctg atgaggatac aaattctagt atagcttgtc 180
 ctagctcagg tgtttttcaa aataatacga ctagagatgt agatatagcc aatcctgata 240
 atgtgggtac tgttgatgat agaacctgtt atgcagatta ttatgaaact agtgtttatg 300
 gagaaacttg gggagcatat aacataacct ttaattctaa tcattgggat gcacctaaca 360
 cattacaacc tagaatagag cgatcattat caaggtctca agaaactggg gtgggaagtt 420
 atgcgcgatt cactgggaca ttgagaattc ttgaagtgg taataccggg actttcggta 480
 gtactggaag ttatctgatg caggccaaag gtaagcacac gggcgggtgg ggatcaaatg 540
 atccggcgat ctgtttgtat ttagcaagac cagtttatgg acctgacgct aatggtaatc 600
 aagtacaggt atcatttgat atttggaggg aacagatcaa ttttagaggg ggatccggag 660
 cagctggaag aaccgaggtc tttcttagaa atgtttttaa agatgaaata attgatatag 720
 aattagaagt aggatttaga caagatccta atgatcctaa tttaaaaata cactattctg 780
 atgctatcat aggtgggtcaa gtatttaatt ggaatattcc ggaaccagaa cgaggaagag 840
 aatctgggat cagatatggg gtttaccgtg taaaaggagg aagagcaca atgagatggg 900
 caaatacgac ttatcagaaa gtagaagttg tagataatag tactatccct gcagcagata 960
 tttacaggat aaaaaatgta gagactggag aatatttaac atcatcaggg tcaagcatta 1020
 tcgcaagtac gtcaggaact ggttcagata aagaatggga gataatctca gctggatctg 1080
 gctctagcta tgtcaatatc gatagtcaag ttagaggaat aataagattt actggtggat 1140
 cgtcaaatcc aggattagta agtacaaatt tttcaccgcc aaatacagat acagataaag 1200
 tatggactgt tattgataat aatgatggaa ctgttagttt tgaaacacgt aatctgggta 1260
 ggtttttata tcatgatacc aataatatga taacacattc agctaataata gatgatagaa 1320
 gtaaattgaa tcttgaatcc actactttaa gtgttgatag tcagcaaatt gcttctgtag 1380
 gtgtgtatcc taaccctacg gttgatggct ttacaatatc cttagataat attagtgtc 1440
 agaaagttca aattttcaac cttttaggaa tgttgggata cgaacaaaag acaaatgagt 1500
 caagtatcca catagataac atggataact ttgattcagg tatgtatatc attagtgtca 1560
 ccgcaaatga taacaaggtt tatcaaacca agctcattgt aaattag 1607

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 <400> 14
 Ala Leu Leu Gly Gly Gln Val Phe Asn Trp Asn Leu Pro Glu Ser
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 20
 <400> 15
 Asx Glu Gln Leu Asn Phe Arg
 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 30
 <400> 16
 Leu Glu Leu Leu Asp Leu Glu Leu Glu
 1 5
 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 40
 <400> 17
 Thr Gly Val Gly Ser Tyr Ala Arg
 1 5
 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 50
 <400> 18
 Asx Pro Val Tyr Gly Asn Gln Val Gln Val Ser Phe Asp Leu Trp Arg
 1 5 10 15
 55
 <210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CNCM n° I-4324

5 <400> 19
Gly Gly Gly Gly Ser Asn Asp Pro Ala Leu Cys Leu Tyr Leu Ala Arg
1 5 10 15

<210> 20
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CNCM n° I-4324

15 <400> 20
Ala Cys Pro Ser Ser Gly Val Phe Gln
1 5

<210> 21
<211> 6
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CNCM n° I-4324

25 <400> 21
Leu Leu Ser Gly Trp Gly
1 5

<210> 22
<211> 8
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CNCM n° I-4324

35 <400> 22
Asx Val Tyr Asp Asn Thr Leu Val
1 5

<210> 23
<211> 8
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CNCM n° I-4324

45 <400> 23
Phe Gly Val Thr Gly Pro Pro Thr
1 5

50 <210> 24
<211> 8
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 588 245 T3

<220>
 <223> CNCM n° I-4324
 5 <400> 24
 Asp Leu Leu Gly Asn Thr Leu Asp
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CNCM n° I-4324
 15 <400> 25
 Asx Asp Thr Asp Leu Pro Asn Pro Arg
 1 5

<210> 26
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CNCM n° I-4324
 25 <400> 26
 Ala Thr Gly Ala Gly
 1 5

<210> 27
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CNCM n° I-4324
 35 <400> 27
 Asx Ser Cys Tyr Ala Asn Tyr Ser Glu Ser Ser Leu Leu Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 16
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CNCM n° I-4324
 45 <400> 28
 Asx Asp Asp Pro Asn Asn Pro Gly Glu Thr Leu His Tyr Ala Trp Lys
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CNCM n° I-4324
 55 <400> 29

Asx Phe Trp Gly Leu Tyr Asn Leu Thr Asp
 1 5 10

5 <210> 30
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CNCM n° I-4324

<400> 30
 Leu Leu Glu Val Gly Asn Thr Gly Thr Phe Gly Ser Thr Gly Ser Tyr
 1 5 10 15

Leu Met Gln Ala Lys
 ç 20

15 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 <400> 31

Asp Leu Ala Asn Pro Asp Asn Val Gly Thr Val Asp Asp Arg
 1 5 10

25 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CNCM n° I-4324

<400> 32
 Gln Glu Met Ala Leu Leu Met Gln Glu Val Asp Trp Asn Leu Pro Glu
 1 5 10 15

35 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> CNCM n° I-4324

<400> 33

Ala Asp Leu Tyr Arg
 1 5

45 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> CNCM n° I-4324

<400> 34

Val Val Asp Asn Ser Thr Leu Pro Ala Ala Asp Leu Tyr Arg
 1 5 10

5 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 <400> 35

Ala Asp Leu Tyr Arg
 1 5

15 <210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 <400> 36

Tyr His Asp Thr Asn Asn Met Leu Thr His Ser Ala Asn Leu Asp Asp
 1 5 10 15

Arg

25 <210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CNCM n° I-4324
 <400> 37

Leu Tyr Glu Asn Gly Glu Leu Val Asp Glu Phe Leu
 1 5 10

35 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>

10 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 38
 gtnggnaaya cnggnacntt ygg 23

15 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 39
 ccnaaygayc cnaayttaa 20

40 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 40
 gcnaayccng ayaaygtngg 20

65 <210> 41

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (21)..(21)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 41
 40 acnytnccng cngcngayyt nta 23
 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 42
 65 ggngncarg tnttyaaytg g 21

<210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <400> 43
 ggncaracny tncaytaygc ntgg 24
 30
 <210> 44
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n es a, c, g o t
 60
 <400> 44
 ccraangtnc cngtrttnc nac 23
 65

<210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

 25 <400> 45
 ttarrttng grtcrttngg 20

 <210> 46
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o t

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

 50 <400> 46
 ccnacrtrt cnggrttngc 20

 <210> 47
 <211> 23
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 65 <223> n es a, c, g o t

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o t

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g o t

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n es a, c, g o t

30
 <400> 47
 tanartcng cngcnggnar ng t 23

35
 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Cebador

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o t

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, c, g o t

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n es a, c, g o t

60
 <400> 48
 ccarttraan acytnccnc c 21

65
 <210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Cebador

75
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g o t

ES 2 588 245 T3

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n es a, c, g o t

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n es a, c, g o t

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n es a, c, g o t

20 <400> 49
ccangcrtar tgnarnngtyt gncc 24

25 <210> 50
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

35 <400> 50
ctaggttgta atgtgttagg tgcacccc 28

40 <210> 51
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador

50 <400> 51
gtgaatcgcg cataactcc cacacc 26

55 <210> 52
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Cebador

65 <400> 52
cccgtgtgct taccttggc ctgc 24

70 <210> 53
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> Cebador

80 <400> 53
gcagctggaa gaaccgaggt ctttc 25

85 <210> 54
<211> 26
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 54
 ccggaaccag aacgaggaag agaatc 26
 <210> 55
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 55
 ggaggaagag cacaaatgag atgggc 26
 20 <210> 56
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 56
 30 cacgtaatct gggtaggtt ttatatcatg atacc 35
 <210> 57
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 57
 40 gcttctgtag gtgtgtatcc taacc 26
 <210> 58
 <211> 29
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 58
 gctggacgtg tgtctctt gtattacgc 29
 <210> 59
 <211> 16
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, c, g o t
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o t
 5 <400> 59
 tgwgnagwan casaga 16
 <210> 60
 <211> 16
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, c, g o t
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o t
 25 <400> 60
 agwgnagwan cawagg 16
 <210> 61
 <211> 16
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, c, g o t
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o t
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g o t
 50 <400> 61
 wgtgnagwan canaga 16
 <210> 62
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g o t
 65

<400> 62
ntcgastwts gwgtt 15
5 <210> 63
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<220>
15 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es a, c, g o t

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n es a, c, g o t

<400> 63
ngtcgaswga nawgaa 16
25 <210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CNCM n° I-4324

<400> 64
35 Val Gly Asn Thr Gly Thr Phe Gly
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CNCM n° I-4324

45 <400> 65
Ala Asn Pro Asp Asn Val Gly
1 5

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CNCM n° I-4324

55 <400> 66
Thr Leu Pro Ala Ala Asp Leu Tyr
1 5

<210> 67

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> CNCM n° I-4324

<400> 67

Gly Gly Gln Val Phe Asn Trp
1 5

10
<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> CNCM n° I-4324

<400> 68

Gly Gln Thr Leu His Tyr Ala Trp
1 5

20
<210> 69
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> CNCM I 4324

30
<400> 69
gggggggat ctgcgctga tgaggataca aattct 36

35
<210> 70
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> CNCM I 4324

<400> 70
ccccccaat tgtatctg acgtactgc gataatgct 39

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ulvano liasa que tiene una actividad idurónico y glucurónico liasa extraída del microorganismo depositado el 17 de junio 2010 con el número I-4324 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia, de 46 kD de secuencia SEQ ID N.º 4.
2. Ácido nucleico de secuencia SEQ ID N.º 8.
- 10 3. Vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 o un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Microorganismo depositado el 17 de junio de 2010 con el número I-4324 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) 25 rue du docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia.
6. Procedimiento de fabricación de una ulvano liasa de acuerdo con la reivindicación 1, por recombinación genética utilizando un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 o un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
- 20 7. Procedimiento de degradación de ulvanos que comprende una etapa de puesta en contacto de los ulvanos con una ulvano liasa de acuerdo con la reivindicación 1 o con una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4 o con un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en las condiciones que permiten la degradación de los ulvanos por digestión enzimática con dicha proteína o dicho huésped o dicho microorganismo.

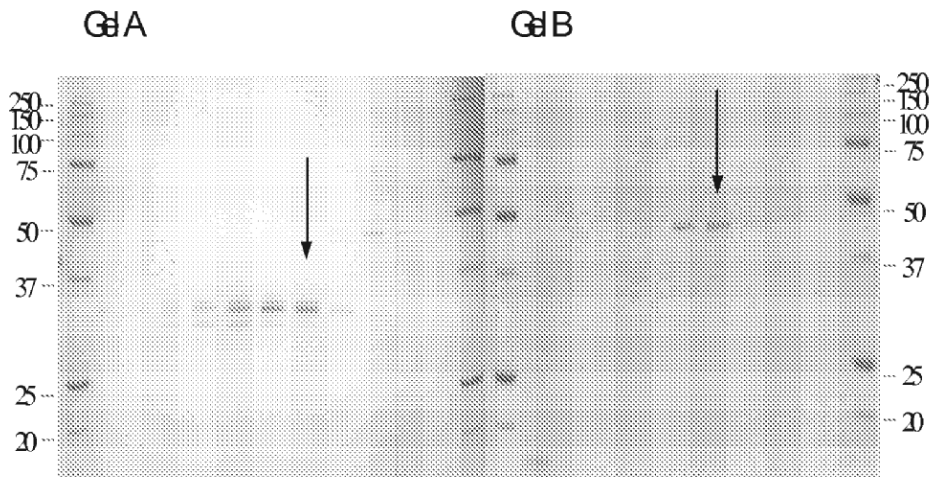


Figura 1

MVFFKDLFIFKSLIKGSLYSGHMKKLLNLYLPLFALMLFTVSMMAQTAPDEDTNSSIACP
 SSGVFQNNTRDVIDIANPDNVGTVDVRTCYADYYETSVYGETWGAYNITFNSNHWDAPNT
 LQPRIERSLSRSQETGVGSYARFTGTLRILEVGNTGTFGSTGSYLMQAKGKHTGGGGSND
 PAICLYLARPVYGPDANGNQVQVSFDIWREQINFRGGSGAAGRTEVFLRNVLKDEIIDIE
 LEVGFQRQDPNDPNLKIHYSDAIIGGQVFNWNIPEPERGRESGIRYGVYRVKGGRAQMRWA
 NTTYQKVEVVDNSTIPAADIYRIKNVETGEYLTSSGSSIIASTSGTGSDKEWEIISAGSG
SSYVNIDSQVRGIIRFTGGSSNPGLVSTNFSPPNTDIDKVTVIDNNDGTVSFETRNLGR
FLYHDTNNMITHSANIDDRSKWNLESTTLSVDSQQIASVGVYPNPTVDGFTIISLDNISAE
KVQIFNLLGMLVYEQKTNESSIHDNMDNFDSGMYIISVTANDNKVYQTKLIVN

Figura 2

**ATGGTGTTTTTTAAAGATTTATTCATCTTTAAATCTTTAATTAAAGGATCTTTATATTCA
GGACACATGAAAAAAAAAATTATTGAATTATTTACCATTGTTGCATTGATGCTATTTACA
GTGTCAATGATGGCTCAAACA**AGCGCCTGATGAGGATACAAATCTAGTATAGCTTGTCCCT
AGCTCAGGTGTTTTTCAAATAATACGACTAGAGATGTAGATATAGCCAATCCTGATAAT
GTGGGTACTGTTGATGATAGAACCCTGTTATGCAGATTATTATGAACTAGTGTATGGA
GAACTTGGGGAGCATATAACATAACCTTTAATTCTAATCATTGGGGATGCACCTAACACA
TTACAACCTAGAATAGAGCGATCATTATCAAGGTCTCAAGAACTGGTGTGGGAAGTTAT
GCGCGATTCACTGGGACATTGAGAATCTTGAAGTTGGTAATACCGGTACTTTTCGGTAGT
ACTGGAAGTTATCTGATGCAGGCCAAAGGTAAGCACACGGGCGGTGGTGGATCAAATGAT
CCGGCGATCTGTTTGTATTTAGCAAGACCAGTTTATGGACCTGACGCTAATGGTAATCAA
GTACAGGTATCATTGATATTTGGAGGGAACAGATCAATTTAGAGGTGGATCCGGAGCA
GCTGGAAGAACCAGGTCTTTCTTAGAAAATGTTTTAAAAGATGAAATAATTGATATAGAA
TTAGAAGTAGGATTTAGACAAGATCCTAATGATCCTAATTTAAAAATACACTATTCTGAT
GCTATCATAGGTGGTCAAGTATTTAATTGGAATATTCCGGAACCAGAACGAGGAAGAGAA
TCTGGTATCAGATATGGGGTTTACCGTGTAAAAGGAGGAAGAGCACAAATGAGATGGGCA
AATACGACTTATCAGAAAGTAGAAGTTGTAGATAATAGTACTATCCCTGCAGCAGATATT
TACAGGATAAAAAATGTAGAGACTGGAGAATATTTAACATCATCAGGTTCAAGCATTATC
GCAAGTACGTCAGGAACTGGTTCAGATAAAGAATGGGAGATAATCTCAGCTGGATCTGGC
TCTAGCTATGTCAATATCGATAGTCAAGTTAGAGGAATAATAAGATTTACTGGTGGATCG
TCAAATCCAGGATTAGTAAGTACAAATTTTTACCAGCCAAATACAGATACAGATAAAGTA
TGGACTGTTATTGATAATAATGATGGAAGTGTAGTTTTGAAACACGTAATCTGGGTAGG
TTTTTATATCATGATACCAATAATATGATAACACATTCAGCTAATATAGATGATAGAAGT
AAATGGAATCTTGAATCCACTACTTTAAGTGTGATAGTCAGCAAATTGCTTCTGTAGGT
GTGTATCCTAACCCCTACGGTTGATGGCTTTACaATATCCTTAGATAATATTAGTGCTGAG
AAAGTTCAAATTTTCAACCTTTTAGGAATGTTGGTATACGAACAAAAGACAAATGAGTCA
AGTATCCACATAGATAACATGGATAACTTTGATTTCAGGTATGTATATCATTAGTGTCACC
GCAAATGATAACAAGGTTTATCAAACCAAGCTCATTGTAAATTAG

Figura 3

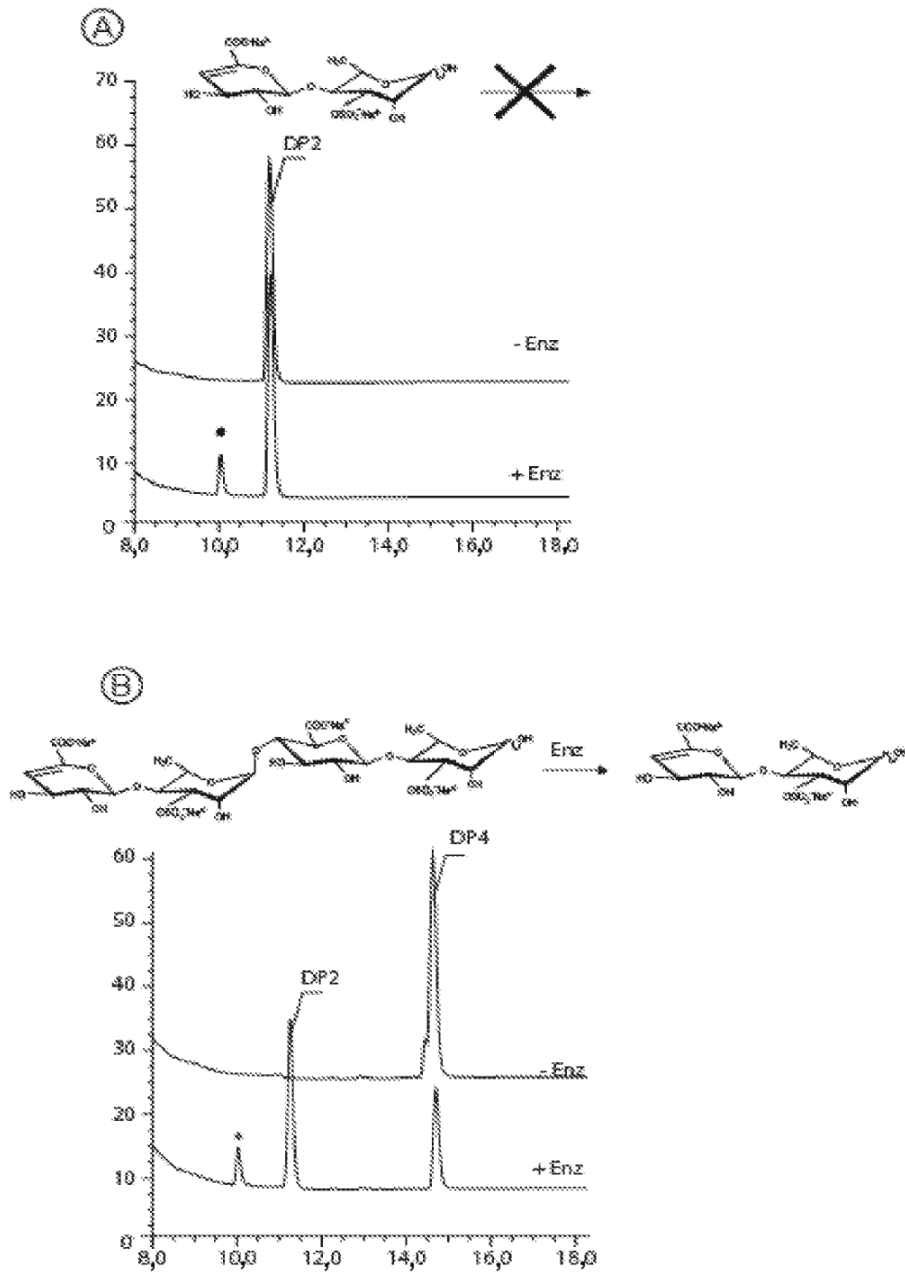


Figura 4

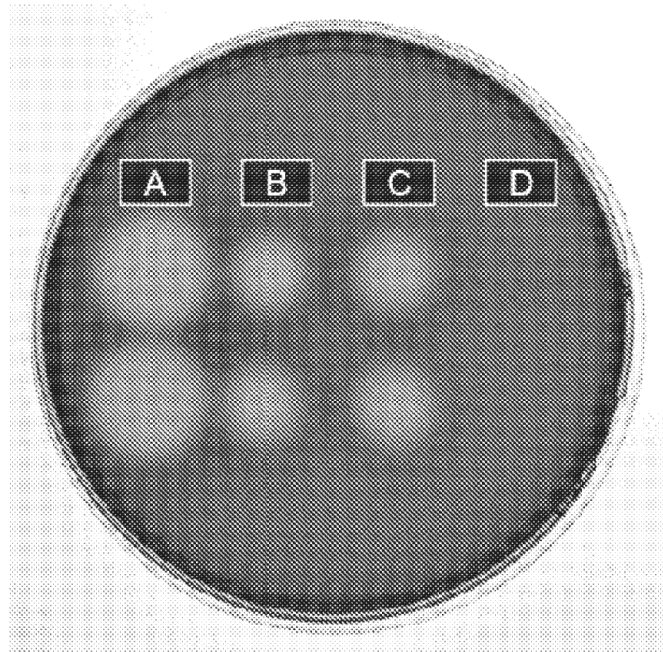


Figura 5

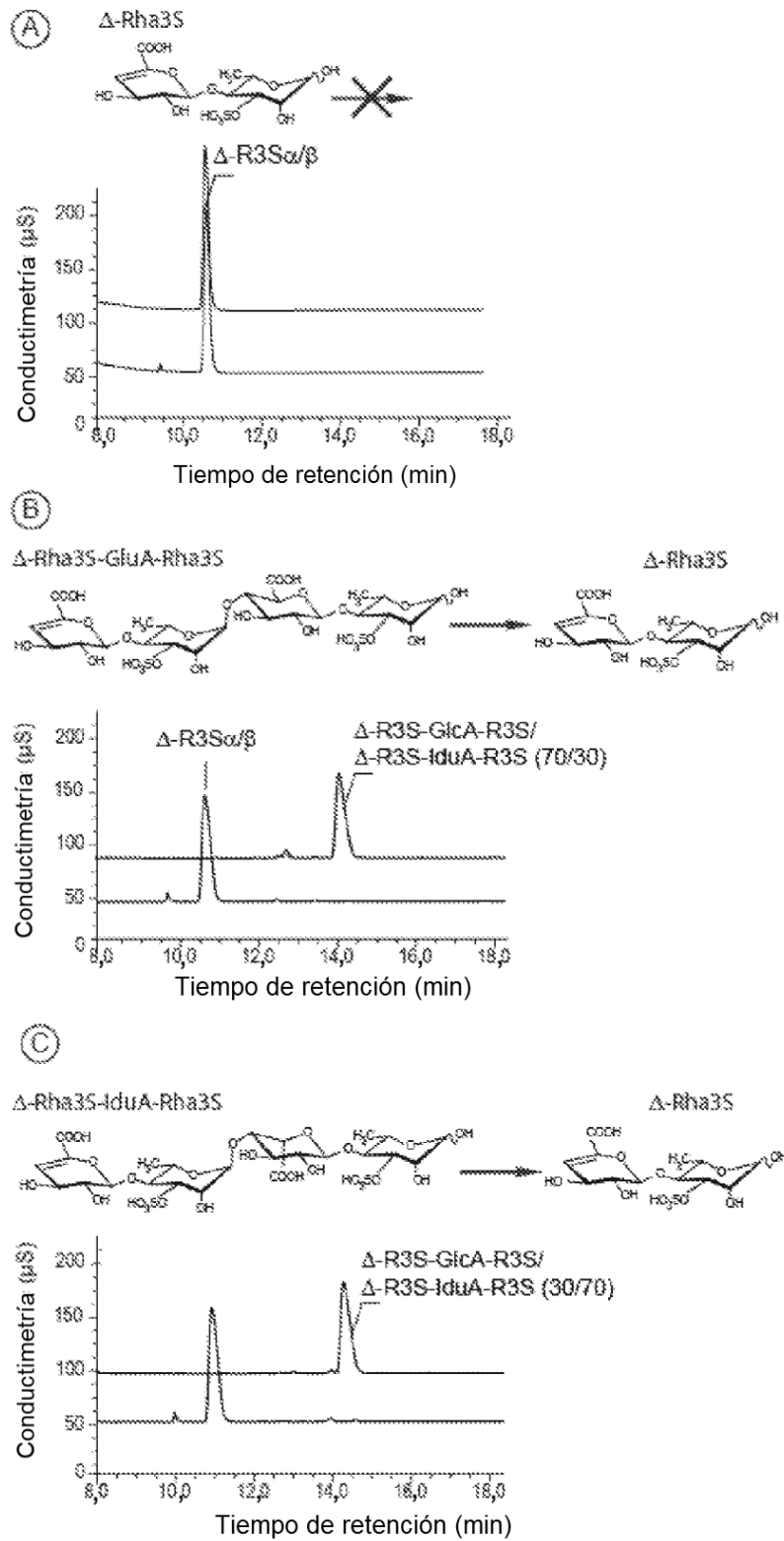


Figura 6