

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 591 359**

51 Int. Cl.:

A23C 9/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2008 PCT/EP2008/066624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09071539**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2008 E 08856318 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2234501**

54 Título: **Método para producir un producto lácteo de bajo contenido en lactosa**

30 Prioridad:

03.12.2007 EP 07122110

21.05.2008 EP 08156674

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

28.11.2016

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

HENRIKSEN, HANNE VANG;

ERNST, STEFFEN;

WILTING, REINHARD;

TAMS, JEPPE WEGENER;

RUNGE, METTE OERHRSTROEM y

GULDAGER, HELLE, SKOV

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 591 359 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir un producto lácteo de bajo contenido en lactosa

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente invención comprende un listado de secuencias.

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método para producir un producto lácteo empleando una enzima que tiene actividad lactasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La intolerancia a la lactosa es quizás la hipersensibilidad alimentaria más conocida en los Estados Unidos y otras partes del mundo. Se estima que aproximadamente el 70% de la población mundial tiene una capacidad limitada controlada genéticamente para digerir la lactosa. Por lo tanto, para ayudar a las personas que no digieren productos lácteos a conservar los productos lácteos en su dieta, existe una creciente demanda de productos alimenticios lácteos que no contengan o que solamente contengan niveles bajos de lactosa.

15 La lactasa se utiliza comercialmente para descomponer la lactosa de la leche para producir productos lácteos que son adecuados para personas con intolerancia a la lactosa y/o para que tengan un sabor más dulce. Debido a que la glucosa y la galactosa son más dulces que la lactosa, la lactasa produce un sabor más agradable. La lactasa también se utiliza en la fabricación de helados. La lactosa cristaliza a las bajas temperaturas del helado, mientras que la glucosa y la galactosa permanecen líquidas y contribuyen a una textura más suave. La lactasa también se utiliza en la conversión de suero lácteo en jarabe. La lactasa también se utiliza para la producción de leche condensada.

20 Las lactasas se han aislado a partir de una gran variedad de organismos, incluyendo microorganismos. La lactasa es frecuentemente un componente intracelular de microorganismos tales como *Kluyveromyces* y *Bacillus*. *Kluyveromyces*, especialmente *K. fragilis* y *K. lactis*, y otros hongos tales como los de los géneros *Candida*, *Torula* y *Torulopsis*, son una fuente común de lactasas fúngicas, mientras que *B. coagulans* y *B. circulans* son fuentes bien conocidas de lactasas bacterianas. Están disponibles diversas preparaciones comerciales de lactasa obtenidas a partir de estos organismos, tales como Lactozima[®] (disponible en Novozymes, Dinamarca), HA-lactasa (disponible en Chr. Hansen, Dinamarca) y Maxilact[®] (disponible en DSM, Países Bajos), todas procedentes de *K. lactis*. Todas estas lactasas se denominan lactasas neutras porque tienen un pH óptimo entre pH 6 y pH 8. Cuando estas lactasas se utilizan en la producción de, por ejemplo, yogur bajo en lactosa, el tratamiento enzimático se tiene que haber realizado en una etapa distinta antes de la fermentación o se tienen que emplear dosificaciones de enzimas bastante elevadas, ya que su actividad se reduce a medida que disminuye el pH durante la fermentación. Además, estas lactasas no son adecuadas para la hidrólisis de la lactosa en la leche, realizada a temperatura elevada, lo que en algunos casos es beneficioso para conservar un recuento microbiano bajo y, por lo tanto, asegurar una buena calidad de la leche.

35 Se han descrito diversas lactasas extracelulares que tienen un pH óptimo inferior, véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. 5.736.374, que describe un ejemplo de una lactasa de este tipo, producida por *Aspergillus oryzae*.

Se ha descrito que una lactasa procedente de *Bifidobacterium bifidum* tiene una actividad transgalactosiladora elevada, tanto en la forma de longitud completa como especialmente cuando está truncada desde el extremo C-terminal (véase, por ejemplo, Jørgensen et al. (2001), Appl. Microbiol. Biotechnol., 57: 647-652, documento de solicitud PCT WO 2001/090317 o patente EP 1.283.876).

40 Passerat et al. (1995) "Lactase activity of *Bifidobacterium bifidum*", Nutrition Research, vol. 15, n° 9, han utilizado un ensayo *in vitro* para estudiar la actividad lactasa de una suspensión bacteriana de una cepa de *Bifidobacterium bifidum*.

45 Tamm, A. (1994), Management of lactose intolerance; Scand. J. Gastroenterol., 29 Supl. 202, págs. 55-63, describe un método para producir un producto lácteo de bajo contenido en lactosa que comprende el tratamiento de la leche con una enzima que tiene actividad lactasa.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para la producción de productos lácteos, por ejemplo, productos lácteos fermentados, tales como yogur, que tienen un nivel bajo de lactosa mediante el uso de una lactasa. También es un objeto proporcionar un método para la producción de una bebida a base de leche baja en lactosa que tiene una vida útil prolongada mediante el uso de una lactasa, en donde el método da lugar a una baja formación de sabor desagradable y/o una baja formación de color pardo, en comparación con métodos conocidos. La lactasa que se va a utilizar de acuerdo con la invención debe hidrolizar la lactosa de manera eficaz y permitir de manera óptima una hidrólisis de la lactosa casi completa. Especialmente, una lactasa de este tipo debe tener una alta proporción de actividad lactasa frente a transgalactosilasa. Para uso en la producción de productos lácteos fermentados, la lactasa debe ser activa en un amplio intervalo de pH.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que un fragmento truncado en el extremo C-terminal de la lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum*, que se había aislado originalmente y patentado por su capacidad para producir grandes cantidades de galactooligosacáridos a partir de la lactosa, se puede utilizar con mucho éxito para la hidrólisis de la lactosa en la leche. Cuando se somete a ensayo en agua + 100 g/l de lactosa a 37°C, la enzima produce galactooligosacáridos con mucha eficacia, tal y como se describe en la técnica anterior. Sin embargo, cuando se somete a ensayo en leche, la proporción de actividad hidrolítica frente a la transgalactosilante cambia notablemente, dando como resultado una hidrólisis eficaz y muy poca producción de galactooligosacáridos.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para producir un producto lácteo que comprende:

- 10 a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa seleccionado entre leche entera, leche con poca grasa, leche desnatada, leche agria, leche en polvo reconstituida, leche condensada, soluciones de leche en polvo, leche UHT, suero de leche, permeado de suero de leche, suero de leche ácido y nata; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a los aminoácidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2;
- 15 en donde la enzima cuando hidroliza la lactosa contenida en el sustrato a base de leche, tiene una proporción de actividad lactasa frente a transgalactosilasa superior a 1:1, lo que reduce la cantidad de lactosa en el sustrato a base de leche en al menos un 70%.

Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que se pueden lograr niveles muy bajos de lactosa cuando se utiliza la lactasa procedente de *Bifidobacterium bifidum* en comparación con otras lactasas usadas normalmente para el tratamiento de la leche. Otra ventaja inesperada de usar la lactasa de *Bifidobacterium bifidum* es que la enzima es activa a temperaturas elevadas, lo que permite el tratamiento de la leche a, por ejemplo, 52°C, reduciendo de este modo el recuento microbiano y mejorando con ello la calidad de la leche.

Por lo tanto, también se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa, y
 - 25 b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa,
- en donde la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de al menos 50°C.

En una realización preferida, la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de al menos 52°C.

También los inventores han encontrado sorprendentemente que la lactasa de *Bifidobacterium bifidum* es activa en un amplio intervalo de pH.

- 30 Por lo tanto, también se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende
 - a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa, y
 - b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa, en donde el pH óptimo de la actividad lactasa a 37°C es superior a pH 5, y en donde la actividad lactasa de la enzima a pH 5 es de al menos el 50% de su actividad lactasa a pH 6 cuando se mide a 37°C.
- 35 El uso de una enzima lactasa que es activa en un intervalo amplio de pH es especialmente útil para la producción de productos lácteos fermentados, en donde se permite una dosificación baja de la enzima, ya que la enzima todavía es activa durante y después de la fermentación. Además, empleando una enzima de este tipo se pueden alcanzar niveles muy bajos de lactosa en el producto lácteo fermentado.

Por lo tanto, también se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo fermentado con contenido bajo en lactosa que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa,
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa, en donde el pH óptimo de la actividad lactasa a 37°C es superior a pH 5, y en donde la actividad lactasa de la enzima a pH 5 es de al menos el 50% de su actividad lactasa a pH 6 cuando se mide a 37°C, y
- 45 c) fermentar dicho sustrato con un microorganismo.

Los presentes inventores también han descubierto sorprendentemente que en la preparación de leche bebida con contenido bajo en lactosa que tiene una vida útil más larga, la hidrólisis de la lactosa se puede realizar preferentemente a temperatura elevada, tal como a una temperatura de al menos 60°C. Preferentemente, una preparación de este tipo puede comprender simultáneamente una pasteurización reducida y tratamiento con lactasa. Por lo tanto,

también se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa, y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa,

en donde la etapa b) se lleva a cabo entre 10 minutos y 4 horas a una temperatura entre 62°C y 64°C.

- 5 Preferiblemente, la etapa b) en un método de este tipo viene seguida de enfriamiento a menos de 10°C sin tratamiento térmico adicional. Esto permitirá que la enzima todavía sea activa después de enfriar la leche, es decir, durante su almacenamiento. En otro aspecto más preferido, la etapa b) de un método de este tipo viene seguida por un tratamiento UHT.

- 10 En los métodos de la invención, se hidroliza al menos el 70% de la lactosa en el sustrato a base de leche. Preferiblemente, se hidroliza al menos el 80%, tal como al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% de la lactosa en el sustrato a base de leche.

En esta memoria también se describe un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 3 o a un fragmento de la misma.

En esta memoria también se describe un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 4 o a un fragmento de la misma.

- 20 En esta memoria también se describe un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 5 o a un fragmento de la misma.

En esta memoria también se describe un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 6 o a un fragmento de la misma.

En esta memoria también se describe un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 7 o a un fragmento de la misma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Sustrato a base de leche

- 35 El término "leche", en el contexto de la presente invención, ha de entenderse como la secreción láctea obtenida mediante el ordeño de cualquier mamífero, tal como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos.

"Sustrato a base de leche", en el contexto de la presente invención, es leche entera o leche con contenido bajo en grasa, leche desnatada, leche agria, leche en polvo reconstituida, leche condensada, soluciones de leche en polvo, leche UHT, suero de leche, permeado de suero, suero ácido o nata.

Preferiblemente, el sustrato a base de leche es leche o una solución acuosa de leche en polvo descremada.

- 40 El sustrato a base de leche puede estar más concentrado que la leche cruda.

En una realización, el sustrato a base de leche tiene una proporción de proteína frente a lactosa de al menos 0,2, preferiblemente de al menos 0,3, al menos 0,4, al menos 0,5, al menos 0,6 o, más preferiblemente, al menos 0,7.

El sustrato a base de leche puede estar homogeneizado y pasteurizado de acuerdo con métodos conocidos en la

técnica.

"Homogeneización", tal y como se emplea en este documento, significa una mezcla intensiva para obtener una suspensión o emulsión soluble. Se puede llevar a cabo con el fin de romper la grasa de la leche en tamaños de partícula más pequeños de modo que ya no se separe de la leche. Esto se puede lograr impulsando la leche a presión elevada a través de pequeños orificios.

"Pasteurización", tal y como se emplea en este documento, significa reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos, en el sustrato a base de leche. Preferiblemente, la pasteurización se logra manteniendo una temperatura especificada durante un período de tiempo especificado. La temperatura especificada se alcanza generalmente mediante calentamiento. La temperatura y la duración se pueden seleccionar con el fin de destruir o inactivar ciertas bacterias, tales como bacterias nocivas, y/o para inactivar enzimas en la leche. Una etapa de enfriamiento rápido puede seguir a continuación.

Producto lácteo

Un "producto lácteo" en el contexto de la presente invención, puede ser cualquier producto alimenticio en el que uno de los constituyentes principales sea a base de leche. Preferiblemente, el constituyente principal es a base de leche. Más preferiblemente, el constituyente principal es un sustrato a base de leche que ha sido tratado con una enzima que tiene actividad lactasa de acuerdo con un método de la invención. En el contexto de la presente invención, "uno de los constituyentes principales" significa un componente que tiene una materia seca que constituye más del 20%, preferiblemente más del 30% o más del 40% de la materia seca total del producto lácteo, mientras que "el constituyente principal" significa un componente que tiene una materia seca que constituye más del 50%, preferiblemente más del 60% o más del 70% de la materia seca total del producto lácteo.

Un producto lácteo de acuerdo con la invención puede ser, por ejemplo, leche desnatada, leche con contenido bajo en grasa, leche entera, nata, leche UHT, leche que tiene una vida útil más larga, un producto de leche fermentada, queso, yogur, mantequilla, producto lácteo para untar, leche agria, bebida de leche acidificada, crema agria, bebida a base de suero de leche, helado, leche condensada, dulce de leche o una bebida a base de leche con sabor. Un producto lácteo se puede preparar a través de cualquier método conocido en la técnica.

Un producto lácteo puede comprender adicionalmente componentes no lácteos, por ejemplo, componentes vegetales tales como, por ejemplo, aceite vegetal, proteína vegetal y/o hidratos de carbono vegetales. Los productos lácteos también pueden comprender otros aditivos tales como, por ejemplo, enzimas, agentes saborizantes, cultivos microbianos tales como cultivos probióticos, sales, edulcorantes, azúcares, ácidos, fruta, zumos de fruta o cualquier otro componente conocido en la técnica como un componente o aditivo de un producto lácteo.

En una realización de la invención, uno o más componentes de la leche y/o fracciones de leche representan al menos el 50% (peso/peso), tal como al menos el 70%, por ejemplo, al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, del producto lácteo.

En una realización de la invención, uno o más sustratos a base de leche que se han tratado con una enzima que tiene actividad lactasa de acuerdo con un método de la invención, representan al menos el 50% (peso/peso), tal como al menos el 70%, por ejemplo, al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, del producto lácteo.

En una realización de la invención, el producto lácteo es un producto lácteo que no se enriquece mediante la adición de galactooligosacáridos.

En una realización de la invención, el sustrato a base de leche tratado con enzima no se seca antes de ser usado como un ingrediente en el producto lácteo.

En una realización de la invención, el producto lácteo es un helado. En el presente contexto, el helado puede ser cualquier tipo de helado, tal como helado con toda la grasa, helado con contenido bajo en grasa o helado a base de yogur u otros productos lácteos fermentados. El helado se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica.

En una realización de la invención, el producto lácteo es leche o leche condensada.

En una realización preferida de la invención, el producto lácteo es leche UHT. La leche UHT en el contexto de la presente invención es leche que ha sido sometida a un procedimiento de esterilización con el fin de destruir todos los microorganismos, incluyendo las esporas bacterianas. El tratamiento UHT (temperatura ultra alta) puede ser, por ejemplo, un tratamiento térmico durante 30 segundos a 130°C, o un tratamiento térmico durante un segundo a 145°C.

En una realización preferida de la invención, el producto lácteo es leche ESL. Leche ESL en el contexto de la presente invención es leche que tiene una vida útil más larga debido a un tratamiento por microfiltración y/o térmico y que es capaz de mantenerse fresca durante al menos 15 días, preferiblemente durante al menos 20 días, en el estante de una tienda a 2-5°C.

En otra realización preferida de la invención, el producto lácteo es un producto lácteo fermentado, por ejemplo, yogur.

Producto lácteo fermentado

5 Un "producto lácteo fermentado" en el contexto de la presente invención, ha de entenderse como cualquier producto lácteo en el que cualquier tipo de fermentación forma parte del proceso de producción. Ejemplos de productos lácteos fermentados son productos tales como yogur, leche agria, crema de leche, queso quark y queso fresco. Un producto lácteo fermentado se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica.

10 "Fermentación" en el método de la presente invención, significa la conversión de carbohidratos en alcoholes o ácidos a través de la acción de un microorganismo. Preferiblemente, la fermentación en el método de la presente invención comprende la conversión de lactosa a ácido láctico.

En el contexto de la presente invención, "microorganismo" puede incluir cualquier bacteria u hongo que sea capaz de fermentar el sustrato lácteo.

15 Los microorganismos utilizados en la mayoría de los productos lácteos fermentados se seleccionan a partir del grupo de bacterias al cual se hace referencia en general como bacterias de ácido láctico. Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "bacteria de ácido láctico" designa una bacteria gram-positiva, microaerofílica o anaerobia, que fermenta azúcares con la producción de ácidos que incluyen ácido láctico como ácido producido predominantemente, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias de ácido láctico más útiles en la industria se encuentran dentro del orden "Lactobacillales", que incluye *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. y *Propionibacterium* spp. Además, las bacterias productoras de ácido láctico que pertenecen al grupo de las bacterias anaerobias, bifidobacterias, es decir *Bifidobacterium* spp., que se utilizan frecuentemente como cultivos de alimentos aislados o en combinación con bacterias de ácido láctico, se incluyen generalmente en el grupo de bacterias de ácido láctico.

25 Las bacterias de ácido láctico se suministran normalmente en la industria de productos lácteos, ya sea como cultivos congelados o liofilizados para la propagación de arranque a granel o como cultivos denominados "Direct Vat Set" (DVS), destinados a la inoculación directa en un recipiente de fermentación o cuba para la producción de un producto lácteo fermentado. Tales cultivos se denominan, en general, "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

30 Las cepas de bacterias de ácido láctico para cultivos iniciadores empleadas comúnmente se dividen generalmente en organismos mesófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a aproximadamente 30°C y organismos termófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C. Organismos típicos pertenecientes al grupo mesófilo incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Especies bacterianas de ácido láctico termófilo incluyen como ejemplos *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

35 También las bacterias anaerobias que pertenecen al género *Bifidobacterium* que incluye *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium longum* se utilizan comúnmente como cultivos iniciadores lácteos y generalmente se incluyen en el grupo de bacterias de ácido láctico. Además, especies de *Propionibacteria* se utilizan como cultivos iniciadores lácteos, en particular en la fabricación de queso. Adicionalmente, los organismos pertenecientes al género *Brevibacterium* se utilizan comúnmente como cultivos iniciadores alimentarios.

Otro grupo de cultivos iniciadores microbianos son los cultivos fúngicos, que incluyen cultivos de levadura y cultivos de hongos filamentosos que se utilizan en particular en la fabricación de determinados tipos de queso y bebidas. Ejemplos de hongos incluyen *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, *Torula kefir*, *Saccharomyces kefir* y *Saccharomyces cerevisiae*.

45 En una realización de la presente invención, el microorganismo utilizado para la fermentación del sustrato a base de leche es *Lactobacillus casei* o una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

50 Los procesos de fermentación que se van a utilizar en un método de la presente invención son bien conocidos y la persona experta en la técnica sabrá cómo seleccionar las condiciones adecuadas del proceso, tales como la temperatura, el oxígeno, la cantidad y las características del o de los microorganismos, los aditivos tales como, por ejemplo, hidratos de carbono, los sabores, los minerales, las enzimas y el tiempo de procesamiento. Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan con el fin de favorecer la consecución de la presente invención.

55 Como resultado de la fermentación, se baja el pH del sustrato a base de leche. El pH de un producto lácteo fermentado de la invención puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 3,5-6, tal como en el intervalo de 3,5-5, preferiblemente en el intervalo de 3,8-4,8.

En una realización preferida, el producto lácteo fermentado es yogur.

Método para producir un producto lácteo

Se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende:

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- 5 b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a los aminoácidos 28-1931 de SEQ ID NO: 1 o a un fragmento de la misma.

La invención se refiere a un método para producir un producto lácteo que comprende:

- 10 a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa, seleccionado entre leche entera, leche con poca grasa, leche desnatada, leche agria, leche en polvo reconstituida, leche condensada, soluciones de leche en polvo, leche UHT, suero de leche, permeado de suero de leche, suero de leche ácido y nata; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a los aminoácidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2;

en donde la enzima cuando hidroliza la lactosa en el sustrato a base de leche, tiene una proporción de actividad lactasa frente a transgalactosilasa superior a 1:1; y

- 15 en donde la cantidad de lactosa en el producto lácteo se ha reducido en al menos un 70%.

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- 20 b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 3 o a un fragmento de la misma.

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- 25 b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 4 o a un fragmento de la misma.

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- 25 a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 5 o a un fragmento de la misma.

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- 30 a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 6 o a un fragmento de la misma.

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- 35 a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 7 o a un fragmento de la misma.

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa.

el donde la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de al menos 50°C.

- 40 También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa; y

b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa, en donde el pH óptimo de la actividad lactasa a 37°C es superior a pH 5, y en donde la actividad lactasa de la enzima a pH 5 es al menos el 50% de su actividad lactasa a pH 6 cuando se mide a 37°C.

5 La persona experta sabrá cómo determinar la actividad lactasa a diferentes pH y por lo tanto determinar el pH óptimo para la enzima. La actividad lactasa a diferentes pH se puede determinar midiendo la hidrólisis de lactosa a 37°C durante 30 minutos, preferiblemente en un tampón que comprende succinato, HEPES, CHES, KCl, CaCl₂ y MgCl₂, por ejemplo, mediante el uso de un método como el que se describe en los Ejemplos de la presente solicitud. Para evitar dudas, HEPES es un agente tamponador, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico, y CHES es un agente tamponador, ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico.

10 El sustrato a base de leche tratado con enzima puede estar mezclado opcionalmente con otros ingredientes para obtener el producto lácteo. En una realización de la invención, el sustrato a base de leche tratado con enzima se mezcla con otros ingredientes para obtener el producto lácteo.

15 En una realización de la invención, el producto lácteo es leche. En otra realización, el producto lácteo es leche condensada. En otra realización, el producto lácteo es helado. En otra realización, el producto lácteo es leche UHT. En otra realización, el producto lácteo es leche ESL. En aún otra realización, el producto lácteo es un producto lácteo fermentado, por ejemplo, yogur.

El producto lácteo es un producto lácteo con bajo contenido en lactosa. "Bajo contenido en lactosa", en el contexto de la presente invención, significa que la cantidad de lactosa en el producto lácteo, tal como en el producto lácteo fermentado, se ha reducido en al menos un 70%, preferiblemente un 80%, 90%, 95 %, 98%, 99% o 99,5%.

20 Método para producir un producto lácteo fermentado con bajo contenido en lactosa

Se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo fermentado con bajo contenido en lactosa que comprende

a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa,

25 b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa, en donde la actividad lactasa de la enzima a pH 5 es de al menos un 50% de su actividad lactasa a pH 6 cuando se mide a 37°C, y

c) fermentar dicho sustrato con un microorganismo.

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo fermentado con bajo contenido en lactosa que comprende

a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa,

30 b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa, y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% idéntica a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o a un fragmento de cualquiera de ellas, y

c) fermentar dicho sustrato con un microorganismo.

Preferiblemente, en estas realizaciones, la etapa b) y la etapa c) se realizan esencialmente al mismo tiempo.

35 En el contexto del método de la invención, "esencialmente al mismo tiempo" significa que el tratamiento enzimático y la fermentación no se llevan a cabo como etapas separadas, es decir, la incubación del sustrato a base de leche con la enzima no se realiza como una etapa separada antes de la inoculación del microorganismo. En lugar de ello, la enzima y el microorganismo se pueden añadir al sustrato a base de leche esencialmente al mismo tiempo. Es decir, la enzima se puede añadir al sustrato a base de leche inmediatamente antes de la inoculación del microorganismo.
40 "Inmediatamente antes de" en este contexto significa sin una etapa de incubación independiente para la hidrólisis enzimática. Alternativamente, el microorganismo se puede añadir inmediatamente antes de la enzima, o el microorganismo y la enzima se pueden añadir al mismo tiempo. "Esencialmente al mismo tiempo" en el contexto del método de la invención puede significar que la enzima es activa a lo largo de toda la etapa c).

45 "Esencialmente al mismo tiempo" no quiere decir que la hidrólisis enzimática de la lactosa en el sustrato a base de leche se completa cuando se completa la fermentación, es decir, cuando el pH ha bajado a un nivel que impide una actividad de fermentación adicional del cultivo iniciador microbiano.

50 En una realización preferida de la invención, la enzima todavía está activa después de la finalización de la etapa c). En una realización más preferida, la enzima conserva al menos un 20%, tal como al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60% o al menos un 70% de su actividad lactasa después de la finalización de la etapa c), en comparación con su actividad cuando se añade al sustrato a base de leche.

Después de la finalización de la etapa c) puede significar cuando al menos uno de los siguientes apartados es cierto:

- la temperatura se reduce hasta menos de 30°C
- el pH ha alcanzado 4,55
- el pH no ya no disminuye más de 0,2 unidades por hora.

5 En otra realización preferida, menos del 80%, tal como menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30% o menos del 20% de la lactosa se ha hidrolizado después de dos horas de fermentación. "Después de dos horas de fermentación" en el contexto de la invención significa que el sustrato a base de leche, después de haber sido inoculado con el microorganismo, se ha incubado durante dos horas a una temperatura que es apropiada para el proceso de fermentación.

10 En otra realización preferida, menos del 80%, tal como menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30% o menos del 20% de la lactosa se ha hidrolizado cuando el pH del sustrato a base de leche se ha reducido a pH 5.

En aún otra realización preferida, menos del 80%, tal como menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30% o menos del 20% de la lactosa se ha hidrolizado cuando finaliza la etapa c).

15 En una realización preferida, más del 70%, tal como más del 80%, más del 90%, más del 95%, más del 97%, más del 98% o más del 99% de la lactosa en el sustrato a base de leche se ha hidrolizado dos días, es decir, 48 horas, después del inicio de la fermentación. "Inicio de la fermentación" es cuando el sustrato a base de leche se ha inoculado con el microorganismo y se incuba a una temperatura que es apropiada para el proceso de fermentación.

20 En otra realización preferida, más del 70%, tal como más del 80%, más del 90%, más del 95%, más del 97%, más del 98% o más del 99% de la lactosa en el sustrato a base de leche se ha hidrolizado dos días, es decir, 48 horas, después de la finalización de la etapa c).

En otra realización preferida, más del 70%, tal como más del 80%, más del 90%, más del 95%, más del 97%, más del 98% o más del 99% de la lactosa en el sustrato a base de leche se ha hidrolizado en el producto lácteo fermentado final. El "producto lácteo fermentado final" es el producto lácteo fermentado tal y como se vende al consumidor del producto.

25 En las realizaciones de la invención en donde se fermenta el sustrato a base de leche, el tratamiento enzimático se lleva a cabo preferiblemente con el pH natural del sustrato a base de leche durante el proceso de fermentación, es decir, el pH disminuirá gradualmente desde el pH natural del sustrato a base de leche sin fermentar hasta el pH del sustrato a base de leche fermentada. En tal aspecto, el tratamiento enzimático se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura apropiada para el proceso de fermentación.

30 Método para producir un producto lácteo bebido de bajo contenido en lactosa que tiene una vida útil más larga

También se describe en esta memoria un método para producir un producto lácteo de bajo contenido en lactosa que comprende

- a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa, y
- b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa,

35 en donde la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de al menos 60°C.

En una realización preferida, la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de al menos 62°C, tal como al menos 63°C, más preferiblemente a una temperatura de al menos 64°C, tal como al menos 65°C, al menos 67°C o al menos 70°C, y lo más preferido a una temperatura de al menos 75°C.

40 El producto lácteo de bajo contenido en lactosa puede ser leche bebida que tiene una vida útil más larga que la leche fresca que normalmente tiene una vida útil de 4-7 días. Puede tener mejor calidad en comparación con otros productos de bebidas lácteas de bajo contenido en lactosa que tienen una vida útil más larga. Puede tener, por ejemplo, un título microbiano inferior, un sabor menos amargo y/o un color menos marrón.

Preferiblemente, el producto lácteo es leche ESL. Más preferiblemente, el producto lácteo es leche UHT.

45 En un aspecto preferido, el sustrato a base de leche es leche cruda. En otro aspecto preferido, el sustrato a base de leche, preferiblemente leche cruda, no se ha pasteurizado antes de la etapa b).

En un aspecto preferido, no se realiza una pasteurización del sustrato a base de leche tratado con una enzima después de la etapa b).

En un aspecto preferido, la microfiltración del sustrato a base de leche se realiza antes de la etapa b). En ese caso, la enzima debería ser preferentemente estéril. En otro aspecto preferido, la microfiltración del sustrato a base de

leche tratado con enzima se lleva a cabo después de la etapa b).

En un aspecto preferido, la etapa b) se lleva a cabo durante un periodo de tiempo entre 10 minutos y 4 horas a una temperatura entre 62°C y 64°C. En un aspecto más preferido, la etapa b) se lleva a cabo entre 20 minutos y 2 horas a una temperatura entre 62°C y 64°C. En un aspecto aún más preferido, la etapa b) se lleva a cabo entre 20 y 60 minutos, tal como aproximadamente 30 minutos, a una temperatura de aproximadamente 63°C. Esta pasteurización suave simultánea y el tratamiento con lactasa de, por ejemplo, leche cruda, dará lugar a una leche bebida con contenido bajo en lactosa que tiene una calidad más alta en comparación con la leche bebida con contenido bajo en lactosa en donde el tratamiento con lactasa se ha realizado a temperatura baja, por ejemplo, a 5°C durante un máximo de 24 horas, como se utiliza frecuentemente en la industria láctea.

En un aspecto más preferido, la etapa b) va seguida de enfriamiento a menos de 10°C sin un tratamiento térmico adicional. Esto permitirá que la enzima todavía sea activa después de que la leche se haya enfriado, es decir, durante su almacenamiento. Preferiblemente, menos del 80% de la lactosa se ha hidrolizado cuando se completa la etapa b), y más del 90% de la lactosa se ha hidrolizado después de una semana. Más preferiblemente, menos del 60% de la lactosa se ha hidrolizado cuando se completa la etapa b), y más del 95% de la lactosa se ha hidrolizado después de una semana.

En otro aspecto más preferido, la etapa b) va seguida de un tratamiento UHT.

Enzima que tiene actividad lactasa

En la etapa b) en los métodos de la presente invención, el sustrato a base de leche se trata con una enzima que tiene actividad lactasa.

Una lactasa en el contexto de la presente invención es cualquier hidrolasa de glicósido que tiene la capacidad de hidrolizar el disacárido lactosa en monómeros de galactosa y glucosa constituyentes. El grupo de lactasas comprende pero no se limita a enzimas asignadas a la subclase EC 3.2.1.108. Las enzimas asignadas a otras subclases, tales como, por ejemplo, EC 3.2.1.23, también pueden ser lactasas en el contexto de la presente invención. Una lactasa en el contexto de la invención puede tener actividades distintas a la actividad hidrolizante de lactosa, como por ejemplo una actividad transgalactosilante. En el contexto de la invención, la actividad hidrolizante de lactosa de la lactasa se puede denominar su actividad lactasa o su actividad beta-galactosidasa.

Las enzimas que tienen actividad lactasa que se van a utilizar en un método de la presente invención, pueden ser de origen animal, vegetal o de origen microbiano. Las enzimas preferidas se obtienen a partir de fuentes microbianas, en particular a partir de un hongo filamentoso o de levadura, o a partir de una bacteria.

La enzima se puede obtener, por ejemplo, a partir de una cepa de *Agaricus*, por ejemplo, *A. bisporus*; *Ascovaginospora*; *Aspergillus*, por ejemplo, *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*; *Candida*; *Chaetomium*; *Chaetotomasfia*; *Dictyostelium*, por ejemplo, *D. discoideum*; *Kluveromyces*, por ejemplo, *K. fragilis*, *K. lactis*; *Mucor*, por ejemplo, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo, *R. pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, por ejemplo, *S. libertiana*; *Torula*; *Torulopsis*; *Trichophyton*, por ejemplo, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. novalis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Bifidobacterium*, por ejemplo, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*, por ejemplo, *C. freundii*; *Clostridium*, por ejemplo, *C. perfringens*; *Diplodia*, por ejemplo, *D. gossypina*; *Enterobacter*, por ejemplo, *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo, *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo, *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothesium*; *Mucor*; *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*; *Proteus*, por ejemplo, *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo, *P. stuartii*; *Pycnoporus*, por ejemplo, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*; *Ruminococcus*, por ejemplo, *R. torques*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *S. liquefasciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. violeceoruber*; *Trametes*; *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, por ejemplo, *Y. enterocolitica*.

En una realización preferida, la enzima es una lactasa procedente de una bacteria, por ejemplo, de la familia Bifidobacteriaceae, tal como del género *Bifidobacterium*, tal como de una cepa de *B. bifidum*, *B. animalis* o *B. longum*. En una realización más preferida, la enzima es una lactasa procedente de *Bifidobacterium bifidum*. Se da a conocer en el presente documento una enzima que es una lactasa que tiene una secuencia que es al menos 50%, tal como al menos 60%, al menos 70%, al menos 80 %, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a los aminoácidos 28-1931 de SEQ ID NO: 1 o a un fragmento activo de lactasa de la misma. Tal fragmento activo de lactasa de SEQ ID NO: 1 puede ser cualquier fragmento de SEQ ID NO: 1 que tenga actividad lactasa. Un fragmento activo de lactasa de SEQ ID NO: 1 puede ser, por ejemplo, los aminoácidos 28-979, los aminoácidos 28-1170, los aminoácidos 28-1323, los aminoácidos 28-1331 o los aminoácidos 28-1600 de SEQ ID NO: 1.

En una realización, una enzima que tiene actividad lactasa para ser utilizada en un método de la presente descripción, comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a los aminoácidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2. En una realización más preferida, la enzima comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, tal como al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a los aminoácidos

cidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2.

La enzima que tiene actividad lactasa para ser utilizada en un método de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a los aminoácidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, la enzima tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a los aminoácidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2.

En otra realización, una enzima que tiene actividad lactasa para ser utilizada en un método de la presente descripción, tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, la enzima tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, tal como al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 3.

En otra realización, una enzima que tiene actividad lactasa para ser utilizada en un método de la presente descripción, tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 4. Preferentemente, la enzima tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, tal como al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 4.

En otra realización, una enzima que tiene actividad lactasa para ser utilizada en un método de la presente descripción, tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la enzima tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, tal como al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 5.

En otra realización, una enzima que tiene actividad lactasa para ser utilizada en un método de la presente descripción, tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, la enzima tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, tal como al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 6.

En otra realización, una enzima que tiene actividad lactasa para ser utilizada en un método de la presente descripción, tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 7. Preferiblemente, la enzima tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, tal como al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 7.

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se aplica en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. (2000) Trends in Genetics 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización de 10 por hueco abierto, penalización de 0,5 por extensión de hueco, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle marcado como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -no breve) se utiliza como el porcentaje de identidad y se calcula del modo siguiente:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud de la alineación - Número total de huecos en la alineación)

Las lactasas que se van a utilizar en un método de la presente invención pueden ser extracelulares. Pueden tener una secuencia señal en su extremo N-terminal, que se escinde durante la secreción.

Las lactasas que se van a utilizar en un método de la presente invención se pueden obtener a partir de cualquiera de las fuentes mencionadas en esta memoria. La expresión "obtenida a partir de" significa en este contexto que la enzima se puede haber aislado a partir de un organismo en el que está presente de forma natural, es decir, la identidad de la secuencia de aminoácidos de la enzima es idéntica a una enzima natural. La expresión "obtenida a partir de" también significa que las enzimas pueden haber sido producidas de forma recombinante en un organismo hospedador, teniendo la enzima producida de forma recombinante una identidad idéntica a una enzima natural o teniendo una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, que tiene uno o más aminoácidos que se delecionan, insertan y/o sustituyen, es decir, una enzima producida de forma recombinante que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos natural. Dentro del significado de una enzima natural se incluyen variantes naturales. Además, la expresión "obtenida a partir de" incluye enzimas producidas sintéticamente, por ejemplo, mediante la síntesis de péptidos. La expresión "obtenida a partir de" también incluye enzimas que se han modificado, por ejemplo mediante glicosilación, fosforilación etc., ya sea *in vivo* o *in vitro*. Con respecto a la enzima producida de forma recombinante, la expresión "obtenida a partir de" se refiere a la identidad de la enzima y no a la identidad del organismo hospedador en el que se produce de forma recombinante.

La lactasa se puede obtener a partir de un microorganismo mediante la utilización de cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, una preparación de enzima lactasa se puede obtener por fermentación de un microorganismo adecuado y un aislamiento posterior de una preparación de lactasa a partir del caldo fermentado o un microorganismo resultante por métodos conocidos en la técnica. La lactasa también se puede obtener mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Un método de este tipo comprende normalmente el cultivo de una célula hospedadora transformada con un vector de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica la lactasa en cuestión y la secuencia de ADN está ligada funcionalmente con una señal de expresión apropiada, de manera que es

capaz de expresar la lactasa en un medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión de la enzima y la recuperación de la enzima a partir del cultivo. La secuencia de ADN también se puede incorporar en el genoma de la célula hospedadora. La secuencia de ADN puede ser de origen genómico, ADNc o sintético o cualquier combinación de éstos, y se puede aislar o sintetizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

- 5 Las lactasas que se van a utilizar en un método de la presente invención se pueden purificar. El término "purificada" tal como se usa en esta memoria, abarca la proteína enzimática de la lactasa esencialmente exenta de componentes insolubles procedentes del organismo de producción. El término "purificada" también abarca la proteína enzimática de la lactasa esencialmente exenta de componentes insolubles procedentes del organismo natural a partir del cual se ha obtenido. Preferiblemente, también está separada de algunos de los componentes solubles del organismo
10 y el medio de cultivo a partir de los cuales se obtiene. Más preferiblemente, está separada a través de una o más de las operaciones unitarias: filtración, precipitación o cromatografía.

- En consecuencia, la enzima que tiene actividad lactasa se puede purificar, a saber, estando presentes solo cantidades menores de otras proteínas. La expresión "otras proteínas" se refiere en particular a otras enzimas. El término "purificada" tal como se usa en el presente documento también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente otras proteínas y más particularmente otras enzimas presentes en la célula de origen de la lactasa.
15 La lactasa puede ser "sustancialmente pura", es decir, estar exenta de otros componentes procedentes del organismo en el que se produce, es decir, por ejemplo, un organismo hospedador para lactasa producida de forma recombinante. Preferiblemente, la lactasa es una preparación de proteína enzimática pura que tiene al menos 40% (p/p), más preferiblemente al menos 50%, 60%, 70%, 80% o incluso al menos 90% de pureza.

- 20 La expresión enzima que tiene actividad lactasa incluye cualquier compuesto auxiliar que pueda ser necesario para la actividad catalítica de la enzima, tal como, por ejemplo, un aceptor o un cofactor apropiado, que puede estar presente o no de forma natural en el sistema de reacción.

La enzima puede estar en cualquier forma adecuada para el uso en cuestión, tal como, por ejemplo, en forma de un polvo seco o granulado, un granulado que no forma polvo, un líquido, un líquido estabilizado o una enzima protegida.

- 25 La enzima se añade en una cantidad adecuada para lograr el grado deseado de hidrólisis de lactosa en las condiciones de reacción elegidas. La enzima se puede añadir con una concentración de entre 100 y 5000 LAU por litro de sustrato a base de leche, preferiblemente menos de 3000, tal como menos de 1500, menos de 1000, menos de 750 o menos de 500 LAU por litro de sustrato a base de leche.

- 30 En una realización preferida, la enzima se añade con una concentración entre 5 y 100 LAU por g de lactosa en el sustrato a base de leche, preferiblemente menos de 50, tal como menos de 40, menos de 30, menos de 20 o menos de 10 LAU por g de lactosa en el sustrato a base de leche.

- En el contexto de la presente solicitud, 1 unidad de lactasa (1 LAU) es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de glucosa por minuto en tampón M a pH 6,5 y 37°C, con una concentración de lactosa de 4,75% p/v. El tampón M se prepara disolviendo 3,98 g de $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 8,31 g de ácido cítrico, 0,9 g de K_2SO_4 , 2,6 g de K_2HPO_4 , 7,35 g de KH_2PO_4 , 5,45 g de KOH, 4,15 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 3,75 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 1,4 g de $NaHCO_3$ en 4 litros de agua, añadiendo 12,5 ml de NaOH 4 N, ajustando a pH 6,5 usando HCl y añadiendo agua hasta un volumen total de 5 litros.
35

- La actividad en LAU de una lactasa específica se puede determinar con la medición directa de la glucosa liberada a partir de lactosa en las condiciones descritas anteriormente. El experto en la materia sabrá cómo determinar tal actividad. Alternativamente, la actividad se puede determinar utilizando el ensayo de actividad lactasa descrito en el Ejemplo 1 de la presente solicitud. En esta memoria, la actividad se obtiene mediante la comparación con una curva estándar ejecutada con una lactasa de actividad conocida, y la actividad de la muestra desconocida calculada a partir de la misma. La lactasa de actividad conocida puede ser, por ejemplo, Lactozima obtenida a partir de Novozymes A/S, Dinamarca.
40

- 45 En una realización preferida, la enzima que tiene actividad lactasa que se va a utilizar en un método de la presente invención, tiene una actividad lactasa a 37°C y pH 5 que es al menos 55%, tal como al menos 60%, al menos 65%, al menos 70% o al menos 75%, de su actividad lactasa a 37°C y pH 6.

- En otra realización preferida, la enzima que tiene actividad lactasa que se va a utilizar en un método de la presente invención, tiene una actividad lactasa a 37°C y pH 4,5 que es al menos 10%, tal como al menos 20%, al menos 30%, al menos 35% o al menos 40%, de su actividad lactasa a 37°C y pH 6.
50

En otra realización preferida, la enzima que tiene actividad lactasa que se va a utilizar en un método de la presente invención tiene un pH óptimo de la actividad lactasa a 37°C, que es superior a pH 5,5.

- En otra realización preferida, la enzima que tiene actividad lactasa que se va a utilizar en un método de la presente invención tiene una actividad lactasa a una temperatura de 52°C y un pH de 6,5 que es al menos 50%, tal como al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75% o al menos 80%, de su actividad lactasa a una temperatura de 38°C y un pH de 6,5.
55

La persona experta sabrá cómo determinar la actividad lactasa a diferentes pH y temperaturas. La actividad lactasa a diferentes pH y temperaturas se determina preferiblemente mediante el uso de un método tal y como se describe en los Ejemplos de la presente solicitud.

5 En una realización preferida de la presente invención, la Km de la enzima que tiene actividad lactasa a 5°C es inferior a 25 mM, tal como inferior a 20 mM, inferior a 15 mM o inferior a 10 mM. En otra realización preferida, la Km de la enzima que tiene actividad lactasa a 37°C es inferior a 25 mM, tal como inferior a 20 mM o inferior a 15 mM. La persona experta sabrá cómo determinar la Km para la actividad lactasa a una temperatura específica. La Km se puede determinar por el método empleado en los Ejemplos de la presente solicitud.

10 La enzima cuando hidroliza la lactosa en el sustrato a base de leche tiene una proporción de actividad lactasa frente a transgalactosilasa de más de 1:1, tal como más de 2:1 o más de 3:1. El tratamiento enzimático se realiza en condiciones en las que la actividad lactasa de la enzima es mayor que la actividad transgalactosilasa, tal como al menos dos veces mayor o al menos tres veces mayor.

15 La proporción de la actividad lactasa frente a transgalactosilasa en el sustrato a base de leche se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis por HPLC. En una realización preferida, el tratamiento enzimático se realiza en condiciones en las que la lactosa hidrolizada se convierte en cantidades iguales de glucosa libre y galactosa libre.

EJEMPLO 1

Ensayo de la actividad lactasa en tubos Eppendorf a 37°C, pH 6,5

Método:

20 La lactasa hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa. La glucosa se mide según de una versión modificada del ensayo común de glucosa oxidasa / peroxidasa (Werner, W. et al. (1970) Z. analyt. Chem. 252: 224).

25 LAU se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de glucosa por minuto a 37°C, pH 6,5 en tampón M (el tampón M se define en la descripción de la presente solicitud de patente). Alternativamente, la actividad en LAU para una lactasa específica se puede determinar por el método descrito en esta memoria. El valor obtenido se compara con una curva estándar ejecutada con una lactasa de actividad conocida, y la actividad de la muestra desconocida se calcula a partir de la misma. La lactasa de actividad conocida puede ser, por ejemplo, Lactozima obtenida a partir de Novozymes A/S, Dinamarca.

Soluciones:

Tampón de ensayo: succinato 50 mM, HEPES 50 mM, CHES 50 mM, KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,01% de Triton X100, pH 6,5

30 Solución GOD-Perid: fosfato de sodio 65 mM, pH 7, 0,4 g/l de glucosa oxidasa, 0,013 g/l de HRP (peroxidasa de rábano picante), 0,65 g/l de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).

Sustrato:

Lactosa 160 mM, succinato 50 mM, HEPES 50 mM, CHES 50 mM, KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 6,5.

Patrón:

35 Lactozima (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca) con una actividad conocida en LAU/g que se utiliza como patrón, se diluyó en tampón del ensayo en el intervalo de 0,09 - 0,7 LAU/g.

Muestras:

Las muestras de enzima se diluyeron apropiadamente en tampón del ensayo.

Procedimiento:

- 40
1. Se incuban 375 ul de sustrato 5 minutos a 37°C.
 2. Se añaden 25 ul de enzima diluida en tampón del ensayo.
 3. La reacción se detiene después de 30 minutos mediante la adición de 60 ul de NaOH 1 M
 4. Se transfieren 20 ul a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añaden 200 ul de solución GOD-Perid. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 420 nm.

45 EJEMPLO 2

Se prepararon 100 ml de solución de leche desnatada al 9% que tenía aproximadamente 5% de lactosa, mezclando

9 g de leche desnatada en polvo (Kerry) en 91 ml de agua iónica. Se transfirieron 10 ml de la solución a un tubo de ensayo que contenía una barra de agitación magnética y se colocó en un baño de agua a 37°C. Después de 15 min se añadió la enzima. Las enzimas sometidas a ensayo eran Lactozima, una lactasa comercialmente disponible en Novozymes A/S, Dinamarca, que tiene una actividad de 3060 LAU/g, y una lactasa experimental procedente de *Bifidobacterium bifidum* que tiene la secuencia codificada mostrada en SEQ ID NO: 2 y una actividad de 295 LAU/g. Los aminoácidos 1 a 27 de SEQ ID NO: 2 son una secuencia señal que se escinde probablemente y los aminoácidos 1332 a 1341 son un marcador utilizado para la purificación de la enzima experimental.

Las dosificaciones fueron LAU 5640/l de leche de Lactozima y 2700 LAU/l de leche de la lactasa de *Bifidobacterium*. Las muestras de leche fueron tomadas a intervalos regulares de hasta 4 h y la enzima se inactivó por calentamiento a 99°C durante 10 min en un termomezclador. Las muestras se diluyeron apropiadamente y se filtraron a través de un filtro de 0,20 µm.

La hidrólisis de la lactosa se midió utilizando un aparato Dionex BioLC equipado con una columna Dionex PA1 y un detector de impulsos amperiométricos (PAD). Se identificaron los picos y se cuantificaron mediante comparación con patrones conocidos de lactosa, glucosa y galactosa. Los resultados se proporcionan a continuación.

Tabla 1: Lactosa, glucosa y galactosa en leche desnatada reconstituida después del tratamiento con Lactozima o lactasa de *Bifidobacterium*.

Tiempo min	Lactozima			Lactasa de <i>Bifidobacterium</i>		
	Lactosa mM	Glucosa mM	Galactosa mM	Lactosa mM	Glucosa mM	Galactosa mM
5	152	6	5	156	3	3
30	64	92	76	91	71	70
60	35	118	99	45	117	114
120	19	131	111	8	144	142
180	15	141	119	1	155	153
240	14	150	128	1	162	160

Cuando se somete a ensayo en leche con 5% de lactosa, no se observa ninguna actividad transferasa cuando se usa la lactasa de *Bifidobacterium*. La producción de glucosa y la galactosa es igual y la producción total de monosacárido coincide con la que se esperaba de la lactosa hidrolizada. Para comparar, la Lactozima produce menos galactosa que glucosa, mostrando claramente que se han producido galactooligosacáridos. Además, los niveles finales de lactosa son significativamente más bajos cuando se utiliza la lactasa de *Bifidobacterium*, lo que ilustra el valor más inferior de Km de esta enzima.

EJEMPLO 3

Se prepararon 100 ml de 15 o 30% (p/p) de permeado de suero que contenía principalmente lactosa y iones, mezclando 15 o 30 g de polvo de permeado de suero seco por pulverización (Variolac, Arla) en 85 o 70 ml de agua iónica, respectivamente. La solución se vertió en un matraz que contenía una barra de agitación magnética y se colocó en un baño de agua a 37°C. Después de 15 min, se añadió la enzima. Las enzimas sometidas a ensayo eran Lactozima, una lactasa comercialmente disponible en Novozymes A/S, Dinamarca, que tenía una actividad de 3060 LAU/g, y una lactasa experimental procedente de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada que se muestra en SEQ ID NO: 2 y una actividad de 295 LAU/g.

Las dosificaciones fueron 4225 LAU/l de leche de Lactozima y 2025 LAU/l de leche de la lactasa de *Bifidobacterium*. Las muestras de leche fueron tomadas a intervalos regulares de hasta 5,5 h y la enzima se inactivó por calentamiento a 99°C durante 10 min en un termomezclador. Las muestras se diluyeron apropiadamente y se filtraron a través de un filtro de 0,20 µm.

La hidrólisis de la lactosa se midió utilizando un aparato Dionex BioLC equipado con una columna Dionex PA1 y un detector de impulsos amperiométricos (PAD). Se identificaron los picos y se cuantificaron mediante comparación con patrones conocidos de lactosa, glucosa y galactosa.

Los resultados se proporcionan a continuación.

Tabla 2: Lactosa, glucosa y galactosa en 15% de permeado de suero DS después del tratamiento con Lactozima o lactasa de *Bifidobacterium*.

Tiempo min	Lactozima		Tiempo min	Lactasa de <i>Bifidobacterium</i>		
	Lactosa mM	Glucosa mM		Lactosa mM	Glucosa mM	Tiempo min
0	499	1	2	499	1	2
30	312	135	106	410	61	63
60	211	224	155	349	119	122
120	110	295	221	220	199	202
180	66	324	249	149	281	290
240	50	346	279	84	336	348
330	37	372	312	31	350	368

Tabla 3: Lactosa, glucosa y galactosa en 30% de permeado de suero DS después del tratamiento con Lactozima o lactasa de *Bifidobacterium*.

Tiempo min	Lactozima		Tiempo min	Lactasa de <i>Bifidobacterium</i>		
	Lactosa mM	Glucosa mM		Lactosa mM	Glucosa mM	Tiempo min
0	848	1	4	848	1	4
30	824	109	75	819	43	45
60	615	253	150	788	86	83
120	420	370	242	651	159	158
180	291	459	300	625	232	230
240	246	559	373	501	283	273
330	154	544	367	391	333	324
1440	54	649	545	20	727	739

- 5 También cuando se sometió a ensayo con concentraciones de lactosa superiores como en 15% o 30% de permeado de suero de leche, no se producían galactooligosacáridos o se producían muy pocos. Una vez más, los niveles producidos de galactosa y glucosa son iguales y coinciden con la cantidad de lactosa hidrolizada. Para comparar, la Lactozima produce menos galactosa que glucosa, lo que muestra claramente que se han producido galactooligosacáridos.

10 EJEMPLO 4

Perfil del pH (a 37°C) y perfil de la temperatura (a pH 6,5) de la lactasa experimental procedente de Bifidobacterium bifidum utilizando lactosa como sustrato.

Método:

- 15 La lactasa hidroliza la lactosa y se forma glucosa + galactosa. La glucosa se mide según una versión modificada del ensayo común de glucosa oxidasa / peroxidasa (Werner, W. et al. (1970) Z. analyt. Chem. 252: 224).

Perfil del pH

Sustrato:

Lactosa 167 mM, succinato 50 mM, HEPES 50 mM, CHES 50 mM, KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM y pH ajustado a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 con NaOH.

20 Muestra de enzima:

La lactasa experimental procedente de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada mostrada en SEQ ID NO: 2 se diluyó apropiadamente en KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,01% de Triton X100.

Procedimiento:

- Se añadieron 10 ul de muestra de enzima, diluidos en tampón de dilución de la enzima a tubos de PCR a

temperatura ambiente.

- Se añadieron 90 ul de sustrato a temperatura ambiente y se colocaron rápidamente en un termociclador Peltier (PCT-200, MJ Research) a 37°C y se incubaron durante 30 min y luego se colocaron sobre hielo.
 - La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de NaOH 0,25 M.
- 5
- Se transfirieron 20 ul a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron 230 ul de fosfato de sodio 65 mM, pH 7, 0,4 g/l de glucosa oxidasa, 0,013 g/l de HRP, 0,65 g/l de solución ABTS. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 420 nm.

Tabla 4:

pH	Actividad relativa de la lactasa de <i>B. bifidum</i> (% de actividad a pH 6)
3	0
4	4
5	75
6	100
7	85
8	39
9	10
10	4

10 *Perfil de la temperatura*

Sustrato:

Lactosa 167 mM, succinato 50 mM, HEPES 50 mM, CHES 50 mM, KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM y el pH se ajustó a pH 6,5 con NaOH.

Muestra de la enzima:

- 15 La lactasa experimental procedente de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada mostrada en SEQ ID NO: 2, se diluyó apropiadamente en succinato 50 mM, HEPES 50 mM, CHES 50 mM, KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,01 % de Triton X100 y el pH se ajustó a pH 6,5.

Procedimiento:

- 20
- Se añadieron 10 ul de muestra de la enzima, diluidos en tampón de dilución de la enzima a tubos de PCR a temperatura ambiente.
 - Se añadieron 90 ul de sustrato precalentado (en un termociclador de Peltier a 30-70°C) y la incubación se realizó con un gradiente de temp. de 30-70°C durante 30 min. y luego se colocaron sobre hielo.
 - La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de NaOH 0,25 M.
- 25
- Se transfirieron 20 ul a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron 230 ul de fosfato de sodio 65 mM, pH 7, 0,4 g/l de glucosa oxidasa, 0,013 g/l de HRP, 0,65 g/l de solución ABTS. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 420 nm.

Tabla 5:

Temp. °C	Actividad relativa de la lactasa de <i>B. bifidum</i> (% de actividad a 38,1°C)
20	54
21	63
22	64
24	68
26	73

Temp. °C	Actividad relativa de la lactasa de <i>B. bifidum</i> (% de actividad a 38,1°C)
29	81
31	88
34	94
36	96
38	100
43	96
48	91
52	83
57	76
62	58
66	32
69	20
70	17

EJEMPLO 5

Determinación de la Km para enzimas de lactasa a 5°C

Método:

- 5 La lactasa hidroliza la lactosa y se forma glucosa + galactosa. La glucosa se mide según de una versión modificada del ensayo común de glucosa oxidasa / peroxidasa (Werner, W. et al. (1970) Z. analyt. Chem. 252: 224).

Sustrato:

Diferentes concentraciones de lactosa en el intervalo desde Km/5 hasta 10*Km, succinato 50 mM, HEPES 50 mM, CHES 50 mM, KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM y el pH ajustado a pH 6,5 con NaOH.

10 Muestra de la enzima:

La lactasa experimental procedente de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada mostrada en SEQ ID NO: 2 se diluyó apropiadamente en succinato 50 mM, HEPES 50 mM, CHES 50 mM, KCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,01 % de Triton X100, pH ajustado a pH 6,5 con NaOH.

- 15 Se diluyeron 12 g/l de Lactozima (lactasa comercialmente disponible en Novozymes A/S, Dinamarca) 6000 veces en el mismo tampón.

Procedimiento:

- Se añadieron 10 ul de la muestra de la enzima (5°C) a una placa de microtitulación de 96 pocillos sobre hielo.
 - Se añadieron 90 ul de sustrato (5°C) y se incubó durante 2 horas a 5°C.
 - La reacción se detuvo mediante la adición de 100 ul de NaOH 0,25 M.
- 20 • Se transfirieron 20 ul a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añadieron 230 ul de fosfato de sodio 65 mM, pH 7, 0,4 g/l de glucosa oxidasa, 0,013 g/l de HRP, 0,65 g/l de solución ABTS. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 420 nm.

Determinación de la Km:

Se empleó el ajuste no lineal informatizado de mínimos cuadrados y la ecuación de Michaelis-Menten:

25
$$v = (V_{max} \cdot S) / (K_m + S)$$

Las Km para la lactasa de *Bifidobacterium* y de Lactozima se determinaron que eran 8 mM y 30 mM, respectivamente.

En una prueba similar realizada a 37°C, las Km para la lactasa de *Bifidobacterium* y Lactozima se determinaron que eran 13 mM y 30 mM, respectivamente.

EJEMPLO 6

Ensayos con yogur

5 Se pasteurizó leche homogeneizada comercial con 1,5% de grasa a 90°C durante 20 min. Se transfirieron 200 ml de la leche a biberones y se templaron a 43°C. La leche fue inoculada con un cultivo de yogur probiótico congelado procedente de Chr. Hansen, Dinamarca, (F-DVS ABY-3) utilizando un nivel de inoculación de 0,02%. Al mismo tiempo, la enzima se añadió a la leche. Los productos enzimáticos sometidos a ensayo eran Ha-lactasa, una lactasa comercialmente disponible en Chr. Hansen, Dinamarca, que tenía una actividad de 8021 LAU/g y una lactasa experimental de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada mostrada en SEQ ID No. 2 y una actividad de 295 LAU/g.

15 Las dosificaciones fueron 1500, 3000 y 3750 LAU/L de leche de Ha-lactasa y 710, 1420 y 1780 LAU/L de la lactasa de *Bifidobacterium*. Las muestras de leche se fermentaron a 43°C hasta que el pH alcanzó 4,55 al cabo de aproximadamente cinco horas. A continuación, se agitaron los yogures, se enfriaron a 25°C y se colocaron a 8°C para el almacenamiento. Las muestras se recogieron 2 horas después de la adición de cultivo y enzima, con el pH final (pH 4,55) y después de 20-24 horas (Día 1) de almacenamiento a 8°C. La actividad biológica se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico. Las proteínas precipitaron añadiendo ácido perclórico y a continuación se añadieron patrones que contenían MQW.

20 La hidrólisis de la lactosa se midió usando un sistema Dionex ICS-3000 equipado con un Carbpac20 conectado con un detector electroquímico (ED). Se identificaron los picos y se cuantificaron mediante comparación con patrones conocidos de lactosa, glucosa y galactosa. A continuación se proporcionan los resultados de la hidrólisis de lactosa.

Tabla 6: Lactosa en yogur tratado con diferentes dosificaciones de Ha-lactasa o lactasa de *Bifidobacterium*. Una muestra de referencia sin adición de la enzima también se sometió a ensayo

Lactosa (mg/g)							
	Referencia	HA-lactosa			Lactasa de <i>Bifidobacterium</i>		
Tiempo	Sin lactasa	1500 LAU/L	3000 LAU/L	3750 LAU/L	710 LAU/L	1420 LAU/L	1780 LAU/L
Inicial	56,0						
2 h	48,4	13,3	3,4	2,6	29,6	10,2	5,7
pH final	39,0	10,9	2,5	1,9	8,7	0,6	0,6
Día 1	39,3	10,5	2,4	1,8	3,4	0,5	0,5

25 El nivel de lactosa en las muestras de yogur muestra que la Ha-lactasa tiene la mayor actividad al comienzo de la fermentación, durante las dos primeras horas de la fermentación. Después de dos horas, la Ha-lactasa está claramente inactiva debido a la disminución del pH. La lactasa de *Bifidobacterium*, por otro lado, se mantiene activa durante toda la fermentación y también en cierta medida durante el almacenamiento en frío. Con la dosificación más baja de 710 LAU/L sometida a ensayo, el nivel de lactosa se reduce significativamente durante el almacenamiento en frío cuando se usa la lactasa de *Bifidobacterium*.

EJEMPLO 7

35 Se pasteurizó leche homogeneizada comercial con 1,5% de grasa a 90°C durante 20 min. Se transfirieron 200 ml de la leche a biberones y se templaron a 43°C. La leche fue inoculada con un cultivo de yogur probiótico congelado procedente de Chr. Hansen, Dinamarca, (F-DVS ABY-3) utilizando un nivel de inoculación de 0,02%. Al mismo tiempo, la enzima se añadió a la leche. Los productos enzimáticos sometidos a ensayo eran Ha-lactasa, una lactasa comercialmente disponible en Chr. Hansen, Dinamarca, que tenía una actividad de 8021 LAU/g y una lactasa experimental de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada mostrada en SEQ ID No. 2 y una actividad de 295 LAU/g.

40 La dosificación era 1500 LAU/L de leche de Ha-lactasa y 710, 530 y 360 LAU/L de la lactasa de *Bifidobacterium*. Las muestras de leche se fermentaron a 43°C hasta que el pH alcanzó 4,55 al cabo de aproximadamente cinco horas. A continuación, se agitaron los yogures, se enfriaron a 25°C y se colocaron a 8°C para el almacenamiento. Las muestras se recogieron 2 horas después de la adición de cultivo y enzima, con el pH final (pH 4,55) y después de 1, 2, 3 y 7 días de almacenamiento a 8°C. La actividad biológica se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico. Las proteínas precipitaron añadiendo ácido perclórico y a continuación se añadieron patrones que contenían MQW.

45 La hidrólisis de la lactosa se midió usando un sistema Dionex ICS-3000 equipado con un Carbpac20 conectado con

un detector electroquímico (ED). Se identificaron los picos y se cuantificaron mediante comparación con patrones conocidos de lactosa, glucosa y galactosa. A continuación se proporcionan los resultados de la hidrólisis de lactosa.

Tabla 7:

Lactosa (mg/g)					
		Ha-lactasa	Lactasa de <i>Bifidobacterium</i>		
Tiempo	Sin lactasa	1500 LAU/L	710 LAU/L	530 LAU/L	360 LAU/L
Inicial	47,9				
2 h	45,8	4,7	21,2	24,2	29,6
pH final	35,5	2,3	0,8	3,8	9,6
Día 1	33,7	3,1	0,2	0,8	4,7
Día 2		2,7	0,5	0,7	2,9
Día 3		2,6	0,3	0,2	1,5
Día 7		2,6	0,1	0,2	0,3

- 5 Como se describe en el ejemplo anterior, el período de actividad de las dos enzimas analizadas difiere. La Ha-lactasa muestra actividad elevada al inicio de la fermentación, mientras que la lactasa de *Bifidobacterium* permanece activa durante todo el tiempo de fermentación y también durante el almacenamiento en frío. Por lo tanto, después de dos días de almacenamiento, el nivel de lactosa es similar o inferior en las muestras con lactasa de *Bifidobacterium* en comparación con la Ha-lactasa.
- 10 Similares grados de hidrólisis de lactosa se obtienen el día 2 en las muestras de yogur con 1500 LAU/L de Ha-lactasa y muestras de yogur con 360 LAU/L de lactasa de *Bifidobacterium*.

EJEMPLO 8

Ensayos con leche

- 15 Leche homogeneizada comercial con 1,5% de grasa se transfirió a tubos (10 ml) y se calentó en baños de agua a 40°C, 50°C y 55°C, respectivamente. A continuación, la enzima se añadió a las muestras de leche. Los productos enzimáticos sometidos a ensayo eran Ha-lactasa, una lactasa comercialmente disponible en Chr. Hansen, Dinamarca, que tenía una actividad de 8040 LAU/g y una lactasa experimental de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada mostrada en SEQ ID No. 2 y una actividad de 295 LAU/g.

- 20 La dosificación era 1500 LAU/L de leche de Ha-lactasa y 710 LAU/L de lactasa de *Bifidobacterium*. Las muestras se recogieron 2 horas y 4 horas después de la adición de la enzima. La actividad biológica se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico. Las proteínas precipitaron añadiendo ácido perclórico y luego se añadieron patrones que contenían MQW.

- 25 La hidrólisis de la lactosa se midió usando un sistema Dionex ICS-3000 equipado con un CarboPac20 conectado con un detector electroquímico (ED). Se identificaron los picos y se cuantificaron mediante comparación con patrones conocidos de lactosa, glucosa y galactosa. A continuación se proporcionan los resultados de la hidrólisis de lactosa.

Tabla 8:

Lactosa (mg/g)							
	Referencia	HA-lactasa - 1500 LAU/L			Lactasa de <i>Bifidobacterium</i> - 710 LAU/L		
Tiempo	Sin lactasa	40°C	50°C	55°C	40°C	50°C	55°C
2 h	46,5	24,0	34,9	40,6	29,3	21,0	31,7
4 h	46,5	19,8	37,3	39,6	12,5	11,2	25,6

- 30 Con las temperaturas más elevadas, 50°C y 55°C, la lactasa de *Bifidobacterium* muestra una actividad significativamente más alta en comparación con la Ha-lactasa. Por otra parte, la lactasa de *Bifidobacterium* se mantiene activa durante el tiempo de reacción de 4 horas, mientras que no se observa ninguna o solo una actividad muy baja de la Ha-lactasa.

EJEMPLO 9*Ensayos con leche - temperatura elevada*

5 Leche homogeneizada comercial con 1,5% de grasa se transfirió a tubos (10 ml) y se calentó a 63°C. La enzima se añadió a las muestras de leche. Los productos enzimáticos sometidos a ensayo eran Ha-lactasa 5200, una lactasa comercialmente disponible en Chr. Hansen (Dinamarca) que tenía una actividad de 8040 LAU/g y Lactoles, una lactasa comercial de *Bacillus* procedente de Daiwa Kasei (Japón) que tenía una actividad de aproximadamente 1500 LAU/g.

10 Las dosificaciones aplicadas fueron 1500 LAU/L de leche de Ha-lactasa y Lactoles, respectivamente. A 63°C se recogieron muestras 15 minutos, 30 minutos, 2 horas y 4 horas después de la adición de la enzima. La actividad enzimática en las muestras se detuvo por adición de ácido sulfúrico y las proteínas precipitaron por la adición de ácido perclórico antes del análisis HPLC.

La hidrólisis de lactosa se midió usando un sistema Dionex ICS-3000 equipado con un CarboPac20 conectado con un detector electroquímico (ED). Se identificaron los picos y se cuantificaron mediante comparación con patrones conocidos de lactosa, glucosa y galactosa. A continuación se proporcionan los resultados de la hidrólisis de lactosa.

15

Tabla 9:

Lactosa (mg/g)			
Tiempo	Referencia-Sin lactasa	HA-lactasa 5200 - 1500 LAU/L	Lactoles - 1500 LAU/L
15 min	48,9	44,6	22,7
30 min	48,9	44,9	22,1
2 h	48,9	44,0	6,7
4 h	48,9	43,2	3,2

A 63°C la Ha-lactasa 5200 se inactiva ya que no se lleva a cabo ninguna hidrólisis durante 4 horas de reacción. Por otro lado, los Lactoles muestran una actividad elevada a esa temperatura durante todo el tiempo de reacción. Después de 4 horas, se obtiene un grado de hidrólisis del 93,4%.

EJEMPLO 10

20 Se prepararon 100 ml de solución de leche desnatada al 9% que tenía aproximadamente 5% de lactosa, mezclando 9 g de leche desnatada en polvo (Kerry) en 91 ml de agua iónica. Se transfirieron 10 ml de la solución a un tubo de ensayo que contenía una barra de agitación magnética y se colocaron en un baño de agua a 5°C. Después de 15 min se añadió la enzima. Las enzimas sometidas a ensayo eran Lactozima, una lactasa comercialmente disponible en Novozymes A/S, Dinamarca, que tenía una actividad de 3060 LAU/g, y una lactasa experimental de *Bifidobacterium bifidum* que tenía la secuencia codificada mostrada en SEQ ID NO: 2 y una actividad de 295 LAU/g. Los aminoácidos 1 a 27 de SEQ ID NO: 2 son una secuencia señal que se escinde probablemente y los aminoácidos 1332 a 1341 son un marcador utilizado para la purificación de la enzima experimental.

25 Las dosificaciones fueron 3000 LAU/l de leche de Lactozima y 1420 LAU/l de leche de lactasa de *Bifidobacterium*. Las muestras de leche se tomaron a intervalos regulares hasta 48 h y la enzima se inactivó mediante calentamiento a 99°C durante 10 min en un termomezclador. Las muestras se diluyeron apropiadamente y se filtraron a través de un filtro de 0,20 µm.

30 La hidrólisis de lactosa se midió utilizando un Dionex BioLC equipado con una columna PA1 y un detector de impulsos amperiométricos (PAD). Se identificaron los picos y se cuantificaron mediante comparación con patrones conocidos de lactosa, glucosa y galactosa. Los resultados se proporcionan a continuación.

35

Tabla 10: Lactosa, glucosa y galactosa en leche desnatada reconstituida después de tratamiento con Lactozima o lactasa de *Bifidobacterium* a 5°C.

Tiempo min	Lactozima			Lactasa de <i>Bifidobacterium</i>		
	Lactosa mM	Glucosa mM	Galactosa mM	Lactosa mM	Glucosa mM	Galactosa mM
125	-	-	-	110	28	31
240	87	64	60	-	-	-
360	-	-	-	70	65	67

Tiempo min	Lactozima			Lactasa de <i>Bifidobacterium</i>		
	Lactosa mM	Glucosa mM	Galactosa mM	Lactosa mM	Glucosa mM	Galactosa mM
460	62	104	91	55	74	76
1410	18	152	134	13	149	148
1620	13	137	125	7	139	140
1865	10	-	-	5	167	167
2870	6	141	132	0,7	139	140

5 Cuando se analiza en leche con 5% de lactosa a 5°C, de nuevo no se observa actividad transferasa cuando se usa la lactasa de *Bifidobacterium*. La producción de glucosa y galactosa es igual y la producción total de monosacárido coincide con la que se esperaba de la lactosa hidrolizada. Para comparar, la Lactozima produce menos galactosa que glucosa, mostrando claramente que se han producido galactooligosacáridos. Además, los niveles finales de lactosa son significativamente más bajos cuando se utiliza la lactasa de *Bifidobacterium*, lo que ilustra adicionalmente el menor valor de la Km de esta enzima.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Novozymes A/S
- 10 <120> Método para producir un producto lácteo
- <130> 11357.204-WO
- <160> 7
- <170> Patent In versión 3.5
- 15 <210> 1
- < 211> 1931
- < 212> PRT
- < 213> *Bifidobacterium bifidum*

ES 2 591 359 T3

<900> 1

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Val Glu Asp Ala
 20 25 30

Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr Pro Glu Val Ala
 35 40 45

Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp
 50 55 60

Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro
 65 70 75 80

Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr
 85 90 95

Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr
 100 105 110

Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg
 115 120 125

Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met
 130 135 140

Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr
 145 150 155 160

Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly
 165 170 175

ES 2 591 359 T3

Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser
 180 185 190

Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val
 195 200 205

Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro
 210 215 220

Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr
 225 230 235 240

Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln
 245 250 255

Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val
 260 265 270

Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr
 275 280 285

Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro
 290 295 300

Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu
 305 310 315 320

Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala
 325 330 335

Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val
 340 345 350

Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val Ala Asn Arg Arg
 355 360 365

Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met Gly Val Asn Ser
 370 375 380

Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu Ile Asp Val Cys
 385 390 395 400

Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe Asp Met Trp Asn
 405 410 415

ES 2 591 359 T3

Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys Trp Phe Gly Gln
 420 425 430

Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp Lys Asp Glu Thr
 435 440 445

Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg Asp Arg Asn Ala
 450 455 460

Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met Met Glu Gly Ile
 465 470 475 480

Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala Lys Leu Val Ala
 485 490 495

Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr Tyr Gly Asp Asn
 500 505 510

Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met Gly Asp Asn Leu
 515 520 525

Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser Asp Gly Ala Asn
 530 535 540

Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala Ile Tyr Gly Ser
 545 550 555 560

Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr Asn Arg Thr Thr
 565 570 575

Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Asn Ser
 580 585 590

Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp Tyr Asp Val Val
 595 600 605

Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr Gly Phe Asp Tyr
 610 615 620

Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser Gly Ala Val Gly
 625 630 635 640

Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile Val Asp Thr Ala
 645 650 655

ES 2 591 359 T3

Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp
660 665 670

Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn Glu Asn Val Val
675 680 685

Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val Tyr Thr Asp Ala
690 695 700

Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser Thr Glu Lys Arg
705 710 715 720

Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr Ala Ala Gly Tyr
725 730 735

Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser Thr Ala His Lys
740 745 750

Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu Gly Thr Ile Ser
755 760 765

Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro Glu Gly Ser Thr
770 775 780

Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala Ala Lys Leu Lys
785 790 795 800

Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly Lys Asp Leu Ser
805 810 815

Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His Ile Val Pro Asp
820 825 830

Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala Gly Lys Leu Val
835 840 845

Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser Tyr Gln Ala Asp
850 855 860

Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile Val Gln Ser Thr
865 870 875 880

Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala Asp Gly Leu Gln
885 890 895

Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro Gly Thr Ser Thr

ES 2 591 359 T3

900	905	910
Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn Tyr Tyr Val Lys 915 920 925		
Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu Val Arg Tyr Ser 930 935 940		
Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp Ala Val Ser Asp 945 950 955 960		
Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala Gly Thr Val Ala 965 970 975		
Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp Glu Ile Gly Ala 980 985 990		
Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr Pro Ala Val Leu 995 1000 1005		
Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr Val Thr Ser 1010 1015 1020		
Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr Val Tyr 1025 1030 1035		
Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val Phe 1040 1045 1050		
Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser 1055 1060 1065		
Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu 1070 1075 1080		
Thr Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala 1085 1090 1095		
Ile Lys Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly 1100 1105 1110		
Ala Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly 1115 1120 1125		
His Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln 1130 1135 1140		

ES 2 591 359 T3

Leu Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val
 1145 1150 1155

Arg Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp
 1160 1165 1170

Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala
 1175 1180 1185

Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala
 1190 1195 1200

Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val Thr Val Thr Asn Ala Asp
 1205 1210 1215

Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly Leu Thr Glu Ile
 1220 1225 1230

Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr Asn Thr Ser Ala
 1235 1240 1245

Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val Ser Asp Ser
 1250 1255 1260

Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile Ala Asp
 1265 1270 1275

Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu Pro
 1280 1285 1290

Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His
 1295 1300 1305

Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu
 1310 1315 1320

Phe Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro Ala Ala Asp Met
 1325 1330 1335

Thr Val Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly Thr Ala Thr Glu
 1340 1345 1350

Gly Pro Lys Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr Ser Thr Tyr Trp
 1355 1360 1365

ES 2 591 359 T3

His Ser Asn Trp Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp Leu Trp Ile Ala
 1370 1375 1380

Phe Glu Leu Gln Lys Pro Thr Lys Leu Asp Ala Leu Arg Tyr Leu
 1385 1390 1395

Pro Arg Pro Ala Gly Ser Lys Asn Gly Ser Val Thr Glu Tyr Lys
 1400 1405 1410

Val Gln Val Ser Asp Asp Gly Thr Asn Trp Thr Asp Ala Gly Ser
 1415 1420 1425

Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly Trp Lys Leu Ala Glu Phe Asn
 1430 1435 1440

Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg Leu Lys Ala Val His Thr
 1445 1450 1455

Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met Ser Ala Ser Glu Ile
 1460 1465 1470

Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile Ser Gly Ala Thr
 1475 1480 1485

Val Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg Val Asp Ala Asp
 1490 1495 1500

His Pro Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr Val Thr Leu Gly
 1505 1510 1515

Asp Ala Thr Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr Ala
 1520 1525 1530

Gly Asn Thr Ala Val Gly Lys Ala Thr Val Thr Val Arg Gly Ile
 1535 1540 1545

Asp Lys Tyr Ser Gly Thr Val Ala Lys Thr Phe Thr Ile Glu Leu
 1550 1555 1560

Lys Asn Ala Pro Ala Pro Glu Pro Thr Leu Thr Ser Val Ser Val
 1565 1570 1575

Lys Thr Lys Pro Ser Lys Leu Thr Tyr Val Val Gly Asp Ala Phe
 1580 1585 1590

ES 2 591 359 T3

Asp Pro Ala Gly Leu Val Leu Gln Leu Asn Tyr Asp Asp Asp Ser
 1595 1600 1605
 Thr Gly Thr Val Thr Trp Asn Thr Gln Thr Ala Gly Asp Phe Thr
 1610 1615 1620
 Phe Lys Pro Ala Leu Asp Ala Lys Leu Lys Val Thr Asp Lys Thr
 1625 1630 1635
 Val Thr Val Thr Tyr Gln Gly Lys Ser Ala Val Ile Asp Ile Thr
 1640 1645 1650
 Val Ser Gln Pro Ala Pro Thr Val Ser Lys Thr Asp Leu Asp Lys
 1655 1660 1665
 Ala Ile Lys Ala Ile Glu Ala Lys Asn Pro Asp Ser Ser Lys Tyr
 1670 1675 1680
 Thr Ala Asp Ser Trp Lys Thr Phe Ala Asp Ala Met Ala His Ala
 1685 1690 1695
 Lys Ala Val Ile Ala Asp Asp Ser Ala Thr Gln Gln Asp Val Asp
 1700 1705 1710
 Asn Ala Leu Lys Ala Leu Thr Asp Ala Tyr Ala Gly Leu Thr Glu
 1715 1720 1725
 Lys Thr Pro Glu Pro Ala Pro Val Ser Lys Ser Glu Leu Asp Lys
 1730 1735 1740
 Lys Ile Lys Ala Ile Glu Ala Glu Lys Leu Asp Gly Ser Lys Tyr
 1745 1750 1755
 Thr Ala Glu Ser Trp Lys Ala Phe Glu Thr Ala Leu Ala His Ala
 1760 1765 1770
 Lys Ala Val Ile Ala Ser Asp Ser Ala Thr Gln Gln Asn Val Asp
 1775 1780 1785
 Ala Ala Leu Gly Ala Leu Thr Ser Ala Arg Asp Gly Leu Thr Glu
 1790 1795 1800
 Lys Gly Glu Val Lys Pro Asp Pro Lys Pro Glu Pro Gly Thr Val
 1805 1810 1815
 Asp Lys Ala Ala Leu Asp Lys Ala Val Lys Lys Val Glu Ala Glu

ES 2 591 359 T3

1820 1825 1830

Lys Leu Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Ala Asp Ser Trp Lys Ala Phe
1835 1840 1845

Glu Thr Ala Leu Ala His Ala Lys Ala Val Ile Gly Asn Ala Asn
1850 1855 1860

Ser Thr Gln Phe Asp Ile Asp Asn Ala Leu Ser Met Leu Asn Asp
1865 1870 1875

Ala Arg Ala Ala Leu Lys Glu Lys Pro Gly Arg Ile Ile Ala Ile
1880 1885 1890

Ile Asp Gly Ser Ala Leu Ser Lys Thr Gly Ala Ser Val Ala Ile
1895 1900 1905

Ile Ala Ser Val Ala Ala Ala Met Leu Ala Val Gly Ala Gly Val
1910 1915 1920

Met Ala Leu Arg Arg Lys Arg Ser
1925 1930

<210> 2
<211> 1341
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum

5

<400> 2
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ile Glu Asp Ala Thr
 20 25 30

Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr Pro Glu Val Ala Tyr
 35 40 45

Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp Ala
50 55 60

Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro Ala
65 70 75 80

Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr Ser
 85 90 95

ES 2 591 359 T3

Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr Leu
 100 105 110

Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg Asp
 115 120 125

Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn
 130 135 140

Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr Gly
 145 150 155 160

Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly Gly
 165 170 175

Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser Arg
 180 185 190

Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val Thr
 195 200 205

Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro Ser
 210 215 220

Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr Lys
 225 230 235 240

Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln Thr
 245 250 255

Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val Thr
 260 265 270

Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr Ser
 275 280 285

Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro Asn
 290 295 300

Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu Asp
 305 310 315 320

Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala Thr
 325 330 335

ES 2 591 359 T3

Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val Ser
 340 345 350

Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val Ala Asn Arg Arg Ala
 355 360 365

Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met Gly Val Asn Ser Ile
 370 375 380

Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu Ile Asp Val Cys Asn
 385 390 395 400

Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe Asp Met Trp Asn Arg
 405 410 415

Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys Trp Phe Gly Gln Ala
 420 425 430

Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp Lys Asp Glu Thr Trp
 435 440 445

Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg Asp Arg Asn Ala Pro
 450 455 460

Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met Met Glu Gly Ile Ser
 465 470 475 480

Gly Ser Val Ser Gly Phe Ser Ala Thr Ser Ala Lys Leu Val Ala Trp
 485 490 495

Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr Tyr Gly Asp Asn Lys
 500 505 510

Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met Gly Asp Asn Leu Thr
 515 520 525

Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser Asp Gly Ala Asn Tyr
 530 535 540

Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala Ile Tyr Gly Ser Glu
 545 550 555 560

Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr Asn Arg Thr Thr Gly
 565 570 575

Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser Tyr Asp Asn Ser Ala

ES 2 591 359 T3

580	585	590
Val Gly Trp 595	Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp Tyr Asp Val Val Gln 600	
Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr Gly Phe Asp Tyr Leu 610	615	620
Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser Gly Ala Val Gly Ser 625	630	635 640
Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile Val Asp Thr Ala Gly 645	650	655
Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp Asp 660	665	670
Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn Glu Asn Val Val Ala 675	680	685
Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val Tyr Thr Asp Ala Ala 690	695	700
Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser Thr Glu Gln Arg Leu 705	710	715 720
Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr Ala Ala Gly Tyr Thr 725	730	735
Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser Thr Ala His Lys Asn 740	745	750
Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu Gly Thr Ile Ser Ala 755	760	765
Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro Glu Gly Ser Thr Glu 770	775	780
Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala Ala Lys Leu Lys Ala 785	790	795 800
Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly Lys Asp Leu Ser Tyr 805	810	815
Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His Ile Val Pro Asp Ala 820	825	830

ES 2 591 359 T3

Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala Gly Lys Leu Val Gly
835 840 845

Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser Tyr Gln Ala Asp Asn
850 855 860

Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile Val Gln Ser Thr Lys
865 870 875 880

Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala Asp Gly Leu Gln Ser
885 890 895

Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro Gly Thr Ser Thr Glu
900 905 910

Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn Tyr Tyr Val Lys Thr
915 920 925

Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu Val Arg Tyr Ser Asp
930 935 940

Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp Ala Val Ser Asp Asp
945 950 955 960

Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala Gly Thr Val Ala Gly
965 970 975

Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp Glu Ile Gly Ala Leu
980 985 990

Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr Pro Ala Val Leu Pro
995 1000 1005

Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr Val Thr Ser Ala
1010 1015 1020

Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr Val Tyr Asn
1025 1030 1035

Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val Phe Gly
1040 1045 1050

Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser Gln
1055 1060 1065

ES 2 591 359 T3

Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr
 1070 1075 1080

Gln Asp Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile
 1085 1090 1095

Lys Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala
 1100 1105 1110

Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His
 1115 1120 1125

Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu
 1130 1135 1140

Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg
 1145 1150 1155

Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly
 1160 1165 1170

Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln
 1175 1180 1185

Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro
 1190 1195 1200

Val Gly Ala Thr Phe Val Arg Val Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr
 1205 1210 1215

Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly Leu Thr Glu Ile Glu
 1220 1225 1230

Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Ala Asn Thr Ser Ala Ala
 1235 1240 1245

Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val Ser Asp Ser Val
 1250 1255 1260

Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile Ala Asp Val
 1265 1270 1275

Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu Pro Ala
 1280 1285 1290

ES 2 591 359 T3

His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His Val
 1295 1300 1305

Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe
 1310 1315 1320

Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Gln His Gln His Gln His Gln
 1325 1330 1335

His Gln Gln
 1340

<210> 3
 <211> 1752
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium bifidum

5

<400> 3
 Met Ala Val Arg Arg Leu Gly Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Val Ala Leu Ser Ile Pro Leu Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala
 20 25 30

Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
 35 40 45

Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
 50 55 60

Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
 65 70 75 80

Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
 85 90 95

Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
 100 105 110

Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
 115 120 125

Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
 130 135 140

Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
 145 150 155 160

ES 2 591 359 T3

Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
 165 170 175

Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
 180 185 190

Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
 195 200 205

Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
 210 215 220

Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
 225 230 235 240

Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
 245 250 255

Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
 260 265 270

Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
 275 280 285

Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
 290 295 300

Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
 325 330 335

Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
 340 345 350

Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
 355 360 365

Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met
 370 375 380

Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 385 390 395 400

ES 2 591 359 T3

Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 405 410 415

Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 420 425 430

Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 435 440 445

Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 450 455 460

Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 465 470 475 480

Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 485 490 495

Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 500 505 510

Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 515 520 525

Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 530 535 540

Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 545 550 555 560

Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 565 570 575

Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser
 580 585 590

Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 595 600 605

Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 610 615 620

Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
 625 630 635 640

ES 2 591 359 T3

Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 645 650 655

Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser
 660 665 670

Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 675 680 685

Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 690 695 700

Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 705 710 715 720

Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
 725 730 735

Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Asp Ser
 740 745 750

Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu
 755 760 765

Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro
 770 775 780

Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
 785 790 795 800

Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
 805 810 815

Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
 820 825 830

Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
 835 840 845

Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
 850 855 860

Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
 865 870 875 880

Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala

ES 2 591 359 T3

885	890	895
Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro 900 905 910		
Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn 915 920 925		
Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu 930 935 940		
Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp 945 950 955 960		
Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala 965 970 975		
Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp 980 985 990		
Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr 995 1000 1005		
Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly 1010 1015 1020		
Thr Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala 1025 1030 1035		
Asp Thr Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr 1040 1045 1050		
Ala Thr Val Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg 1055 1060 1065		
Val Gln Arg Ser Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn 1070 1075 1080		
Ala Leu Arg Leu Thr Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp 1085 1090 1095		
Thr Leu Asp Ala Ile Lys Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn 1100 1105 1110		
Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr 1115 1120 1125		

ES 2 591 359 T3

Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala
 1130 1135 1140

Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp
 1145 1150 1155

Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln
 1160 1165 1170

Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu
 1175 1180 1185

Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr
 1190 1195 1200

Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val Thr Val
 1205 1210 1215

Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly
 1220 1225 1230

Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr
 1235 1240 1245

Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys
 1250 1255 1260

Val Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala
 1265 1270 1275

Ile Ile Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val
 1280 1285 1290

Thr Val Leu Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu
 1295 1300 1305

Ser Glu Asp His Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly
 1310 1315 1320

Thr Glu Gln Glu Phe Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro
 1325 1330 1335

Ala Ala Asp Met Thr Val Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly
 1340 1345 1350

ES 2 591 359 T3

Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr
 1355 1360 1365

Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp
 1370 1375 1380

Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys Pro Thr Lys Leu Asp Ala
 1385 1390 1395

Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser Lys Asn Gly Ser Val
 1400 1405 1410

Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly Thr Asn Trp Thr
 1415 1420 1425

Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly Trp Lys Leu
 1430 1435 1440

Ala Glu Phe Asn Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg Leu Lys
 1445 1450 1455

Ala Val His Thr Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met Ser
 1460 1465 1470

Ala Ser Glu Ile Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile
 1475 1480 1485

Ser Gly Ala Thr Val Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg
 1490 1495 1500

Val Asp Ala Asp His Pro Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr
 1505 1510 1515

Val Thr Leu Gly Asp Ala Thr Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu
 1520 1525 1530

Leu Asp Tyr Ala Gly Asn Thr Ala Val Gly Lys Ala Thr Val Thr
 1535 1540 1545

Val Arg Gly Ile Asp Lys Tyr Ser Gly Thr Val Ala Lys Thr Phe
 1550 1555 1560

Thr Ile Glu Leu Lys Asn Ala Pro Ala Pro Glu Pro Thr Leu Thr
 1565 1570 1575

ES 2 591 359 T3

Ser Val Ser Val Lys Thr Lys Pro Ser Lys Leu Thr Tyr Val Val
 1580 1585 1590

Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala Gly Leu Val Leu Gln His Asp Arg
 1595 1600 1605

Gln Ala Asp Arg Pro Pro Gln Pro Leu Val Gly Glu Gln Ala Asp
 1610 1615 1620

Glu Arg Gly Leu Thr Cys Gly Thr Arg Cys Asp Arg Val Glu Gln
 1625 1630 1635

Leu Arg Lys His Glu Asn Arg Glu Ala His Arg Thr Gly Leu Asp
 1640 1645 1650

His Leu Glu Phe Val Gly Ala Ala Asp Gly Ala Val Gly Glu Gln
 1655 1660 1665

Ala Thr Phe Lys Val His Val His Ala Asp Gln Gly Asp Gly Arg
 1670 1675 1680

His Asp Asp Ala Asp Glu Arg Asp Ile Asp Pro His Val Pro Val
 1685 1690 1695

Asp His Ala Val Gly Glu Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His Val
 1700 1705 1710

Ile Gly Leu Arg Val Asp Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe
 1715 1720 1725

Gln Ile Pro Ala Asp Asp Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly
 1730 1735 1740

Phe His Arg Phe Glu Arg His Val Gly
 1745 1750

<210> 4

< 211> 1935

< 212> PRT

< 213> Bifidobacterium bifidum

5

<400> 4

Met Ala Val Arg Arg Leu Gly Gly Arg Ile Val Ala Phe Ala Ala Thr
 1 5 10 15

Val Ala Leu Ser Ile Pro Leu Gly Leu Leu Thr Asn Ser Ala Trp Ala
 20 25 30

ES 2 591 359 T3

Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
35 40 45

Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
50 55 60

Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
65 70 75 80

Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
85 90 95

Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
100 105 110

Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
115 120 125

Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
130 135 140

Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
145 150 155 160

Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
165 170 175

Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
180 185 190

Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
195 200 205

Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
210 215 220

Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asn Val Thr Met
225 230 235 240

Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Lys Ala Ala Ala Asn Ile
245 250 255

Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
260 265 270

ES 2 591 359 T3

Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
 275 280 285

Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
 290 295 300

Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
 325 330 335

Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
 340 345 350

Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
 355 360 365

Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met
 370 375 380

Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 385 390 395 400

Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val Glu Glu Val Phe
 405 410 415

Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu Asp Tyr Gly Lys
 420 425 430

Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val Leu Gly Gly Asp
 435 440 445

Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser Thr Ile Asn Arg
 450 455 460

Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met
 465 470 475 480

Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro Ala Thr Ser Ala
 485 490 495

Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr Arg Pro Met Thr
 500 505 510

ES 2 591 359 T3

Tyr Gly Asp Asn Lys Ile Lys Ala Asn Trp Asn Glu Ser Asn Thr Met
 515 520 525

Gly Asp Asn Leu Thr Ala Asn Gly Gly Val Val Gly Thr Asn Tyr Ser
 530 535 540

Asp Gly Ala Asn Tyr Asp Lys Ile Arg Thr Thr His Pro Ser Trp Ala
 545 550 555 560

Ile Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala Ile Asn Ser Arg Gly Ile Tyr
 565 570 575

Asn Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gln Ser Ser Asp Lys Gln Leu Thr Ser
 580 585 590

Tyr Asp Asn Ser Ala Val Gly Trp Gly Ala Val Ala Ser Ser Ala Trp
 595 600 605

Tyr Asp Val Val Gln Arg Asp Phe Val Ala Gly Thr Tyr Val Trp Thr
 610 615 620

Gly Phe Asp Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly Ser
 625 630 635 640

Gly Ala Val Gly Ser Trp Pro Ser Pro Lys Asn Ser Tyr Phe Gly Ile
 645 650 655

Val Asp Thr Ala Gly Phe Pro Lys Asp Thr Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser
 660 665 670

Gln Trp Asn Asp Asp Val His Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn
 675 680 685

Glu Asn Val Val Ala Lys Gly Ser Gly Asn Asn Val Pro Val Val Val
 690 695 700

Tyr Thr Asp Ala Ala Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Lys Gly Ser
 705 710 715 720

Thr Glu Lys Arg Leu Ile Gly Glu Lys Ser Phe Thr Lys Lys Thr Thr
 725 730 735

Ala Ala Gly Tyr Thr Tyr Gln Val Tyr Glu Gly Ala Asp Lys Asp Ser
 740 745 750

Thr Ala His Lys Asn Met Tyr Leu Thr Trp Asn Val Pro Trp Ala Glu

ES 2 591 359 T3

755	760	765
Gly Thr Ile Ser Ala Glu Ala Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Leu Ile Pro 770	775	780
Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala 785	790	795
Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly 805	810	815
Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His 820	825	830
Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala 835	840	845
Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser 850	855	860
Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile 865	870	875
Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala 885	890	895
Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro 900	905	910
Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn 915	920	925
Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu 930	935	940
Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp 945	950	955
Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala 965	970	975
Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp 980	985	990
Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr 995	1000	1005

ES 2 591 359 T3

Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly
 1010 1015 1020

Thr Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val Asp Trp Thr Lys Pro Ala
 1025 1030 1035

Asp Thr Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr
 1040 1045 1050

Ala Thr Val Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg
 1055 1060 1065

Val Gln Arg Ser Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn
 1070 1075 1080

Ala Leu Arg Leu Thr Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp
 1085 1090 1095

Thr Leu Asp Ala Ile Lys Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn
 1100 1105 1110

Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr
 1115 1120 1125

Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala
 1130 1135 1140

Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val Met Tyr Phe Phe Arg Asp
 1145 1150 1155

Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly Lys Thr Lys Ile Gln
 1160 1165 1170

Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu Ala Ala Thr Glu
 1175 1180 1185

Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys Pro Tyr Thr
 1190 1195 1200

Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val Thr Val
 1205 1210 1215

Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala Gly
 1220 1225 1230

ES 2 591 359 T3

Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr
 1235 1240 1245

 Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys
 1250 1255 1260

 Val Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala
 1265 1270 1275

 Ile Ile Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val
 1280 1285 1290

 Thr Val Leu Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu
 1295 1300 1305

 Ser Glu Asp His Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly
 1310 1315 1320

 Thr Glu Gln Glu Phe Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro
 1325 1330 1335

 Ala Ala Asp Met Thr Val Thr Ala Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly
 1340 1345 1350

 Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr
 1355 1360 1365

 Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp
 1370 1375 1380

 Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys Pro Thr Lys Leu Asp Ala
 1385 1390 1395

 Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser Lys Asn Gly Ser Val
 1400 1405 1410

 Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly Thr Asn Trp Thr
 1415 1420 1425

 Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly Trp Lys Leu
 1430 1435 1440

 Ala Glu Phe Asn Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg Leu Lys
 1445 1450 1455

ES 2 591 359 T3

Ala Val His Thr Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met Ser
1460 1465 1470

Ala Ser Glu Ile Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile
1475 1480 1485

Ser Gly Ala Thr Val Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg
1490 1495 1500

Val Asp Ala Asp His Pro Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr
1505 1510 1515

Val Thr Leu Gly Asp Ala Thr Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu
1520 1525 1530

Leu Asp Tyr Ala Gly Asn Thr Ala Val Gly Lys Ala Thr Val Thr
1535 1540 1545

Val Arg Gly Ile Asp Lys Tyr Ser Gly Thr Val Ala Lys Thr Phe
1550 1555 1560

Thr Ile Glu Leu Lys Asn Ala Pro Ala Pro Glu Pro Thr Leu Thr
1565 1570 1575

Ser Val Ser Val Lys Thr Lys Pro Ser Lys Leu Thr Tyr Val Val
1580 1585 1590

Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala Gly Leu Val Leu Gln Leu Asn Tyr
1595 1600 1605

Asp Asp Asp Ser Thr Gly Thr Val Thr Trp Asn Thr Gln Thr Ala
1610 1615 1620

Gly Asp Phe Thr Phe Lys Pro Ala Leu Asp Ala Lys Leu Lys Val
1625 1630 1635

Thr Asp Lys Thr Val Thr Val Thr Tyr Gln Gly Lys Ser Ala Val
1640 1645 1650

Ile Asp Ile Thr Val Ser Gln Pro Ala Pro Thr Val Ser Lys Thr
1655 1660 1665

Asp Leu Asp Lys Ala Ile Lys Ala Ile Glu Ala Lys Asn Pro Asp
1670 1675 1680

Ser Ser Lys Tyr Thr Ala Asp Ser Trp Lys Thr Phe Ala Asp Ala

ES 2 591 359 T3

1685		1690		1695
Met Ala	His Ala Lys Ala	Val Ile Ala Asp	Asp Ser	Ala Thr Gln
1700		1705	1710	
Gln Asp	Val Asp Lys Ala	Leu Lys Ala Leu Thr	Asp	Ala Tyr Ala
1715		1720	1725	
Gly Leu	Thr Glu Lys Thr	Pro Glu Pro Ala Pro	Val Ser Lys Ser	
1730		1735	1740	
Glu Leu	Asp Lys Lys Ile	Lys Ala Ile Glu Ala	Glu Lys Leu Asp	
1745		1750	1755	
Gly Ser	Lys Tyr Thr Ala	Glu Ser Trp Lys Ala	Phe Glu Thr Ala	
1760		1765	1770	
Leu Ala	His Ala Lys Ala	Val Ile Ala Ser Asp	Ser Ala Thr Gln	
1775		1780	1785	
Gln Asp	Val Asp Ala Ala	Leu Gly Ala Leu Thr	Ser Ala Arg Asp	
1790		1795	1800	
Gly Leu	Thr Glu Lys Gly	Glu Val Lys Pro Asp	Pro Lys Pro Glu	
1805		1810	1815	
Pro Gly	Thr Val Asp Lys	Ala Ala Leu Asp Lys	Ala Val Lys Lys	
1820		1825	1830	
Val Glu	Ala Glu Lys Leu	Asp Gly Ser Lys Tyr	Thr Ala Asp Ser	
1835		1840	1845	
Trp Lys	Ala Phe Glu Thr	Ala Leu Ala His Ala	Lys Ala Val Ile	
1850		1855	1860	
Gly Asn	Ala Asn Ser Thr	Gln Phe Asp Ile Asp	Asn Ala Leu Ser	
1865		1870	1875	
Met Leu	Asn Asp Ala Arg	Ala Ala Leu Lys Glu	Lys Pro Gly Arg	
1880		1885	1890	
Ile Ile	Ala Ile Ile Asp	Gly Gly Ala Leu Ser	Lys Thr Gly Ala	
1895		1900	1905	
Ser Val	Ala Ile Ile Ala	Ser Val Ala Ala Ala	Met Lys Ala Val	
1910		1915	1920	
Gly Ala	Gly Val Met Ala	Leu Arg Pro Pro Lys	Trp	
1925		1930	1935	

<210> 5
 <211> 2021
 <212> PRT
 <213> Ruminococcus torques

ES 2 591 359 T3

<400> 5

Met Lys Asn Leu Lys Trp Lys Lys Ala Gly Ser Ala Val Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Gly Ser Met Val Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Ala Gln Gly
 20 25 30

Glu Ile Val Gln Leu Glu Gly Gly Thr Ser Thr Gln Thr Asn Thr Ala
 35 40 45

Pro Glu Gln Val Phe Leu Asn Lys Tyr Ser Gly Thr Val Arg Thr Gln
 50 55 60

Asn Phe Asn Asp Asn Trp Lys Phe Tyr Leu Gly Asp Ala Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ser Trp Asp Gln Val Asn Leu Pro
 85 90 95

His Asp Tyr Ser Ile Asp Gln Lys Tyr Ser Gln Lys Met Glu Ala Glu
 100 105 110

Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Asn Phe Thr
 115 120 125

Val Asp Glu Ser Leu Lys Gly Lys Arg Ile Ser Ile Asp Phe Gly Gly
 130 135 140

Val Tyr Met Asn Ala Thr Ile Tyr Val Asn Gly Lys Lys Leu Gly Thr
 145 150 155 160

His Pro Asn Gly Tyr Thr Pro Phe Ser Phe Asp Ile Thr Asp Asn Val
 165 170 175

Lys Phe Gly Lys Glu Asn Val Ile Ala Val Lys Val Asp His Gln Thr
 180 185 190

ES 2 591 359 T3

Pro Ser Ser Arg Phe Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val Asp
195 200 205

Phe Val Val Thr Asp Thr Val His Val Asp Lys Asn Gly Thr Lys Ile
210 215 220

Glu Thr Pro Asp Leu Lys Asp His Ala Asp Gly Asn Asn Val Ala Val
225 230 235 240

Lys Val Lys Thr Thr Val Val Asn Glu Ser Glu Asn Asn Ala Ser Val
245 250 255

Lys Val Lys His Thr Ile Tyr Pro Lys Asn Gly Thr Ala Glu Gln Ala
260 265 270

Val Gly Thr Phe Glu Thr Glu Val Ala Thr Val Asp Lys Gly Lys Ser
275 280 285

Lys Asp Val Gln Ala Asp Phe Thr Val Ser Gly Val Lys Leu Trp Ser
290 295 300

Thr Thr Thr Pro Asn Leu Tyr Thr Val Lys Thr Glu Val Leu Met Asp
305 310 315 320

Gly Thr Thr Val Asp Thr Tyr Glu Thr Asp Tyr Gly Phe Arg Tyr Phe
325 330 335

Asp Phe Asn Asn Asn Thr Gly Phe Ser Leu Asn Gly Gln Lys Met Lys
340 345 350

Leu Gln Gly Val Cys Met His His Asp Gln Gly Ala Leu Gly Ser Val
355 360 365

Ala Asn Asp Arg Ser Thr Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Lys Met Met
370 375 380

Gly Cys Asn Ser Ile Arg Val Thr His Asn Pro Ala Ser Asp Glu Leu
385 390 395 400

Ile Asp Ala Cys Asn Lys His Gly Ile Leu Val Ile Asp Glu Ala Phe
405 410 415

Asp Gly Trp Val Ala Pro Lys Asn Ser Asn Ser Asn Asp Tyr Ser Lys
420 425 430

Trp Phe Asn Lys Lys Ile Glu Asp Gly Asn Glu Ile Met Gly Ala Ala

ES 2 591 359 T3

435	440	445
Glu Asn Met Thr Trp Ala Gln Phe Asp Leu Thr Ala Met Ile Glu Arg 450	455	460
Gly Gln Asn Asp Pro Ala Ile Ile Met Trp Ser Leu Gly Asn Glu Met 465	470	475
Trp Glu Gly Thr Gly Gly Tyr Ser Asp Asp Tyr Lys Thr Ala Gln Asp 485	490	495
Asn Leu Val Lys Trp Ala Lys Ala Ala Asp Thr Thr Arg Pro Val Thr 500	505	510
Thr Gly Asp Asn Lys Leu Lys Ser Asn Glu Thr Gly Ala Ile Thr Leu 515	520	525
Gly Gln Glu Leu Gln Lys Ala Gly Gly Ile His Gly Met Asn Tyr Ser 530	535	540
Gln Glu Trp Lys Asn His Ala Gly Lys Thr His Tyr Asp Met Ile His 545	550	555
Glu Ala Tyr Pro Glu Trp Cys Met Tyr Gly Ser Glu Thr Ala Ser Ala 565	570	575
Val Asn Ser Arg Gly Ile Tyr Lys Gly Met Gly Ser Gln Thr Asp Tyr 580	585	590
Gly Asp Tyr Asp Leu Thr Ser Tyr Asp Thr Ser Ala Val Gly Trp Gly 595	600	605
Ala Thr Ala Ser Ser Ala Trp Tyr Glu Val Ile Lys Arg Asp Phe Ile 610	615	620
Ala Gly Glu Tyr Val Trp Thr Gly Phe Asp Tyr Ile Gly Glu Pro Thr 625	630	635
Pro Trp Asn Gly Thr Gly Gln Gly Lys Pro Gly Asn Ala Ser Arg Trp 645	650	655
Pro Ala Pro Lys Ser Ser Tyr Phe Gly Ile Val Asp Thr Ala Gly Leu 660	665	670
Pro Lys Asp Ser Tyr Tyr Phe Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp Ser Val 675	680	685

ES 2 591 359 T3

Asn Thr Leu His Ile Leu Pro Ala Trp Asn Glu Glu Val Val Tyr Lys
 690 695 700

Lys Ser Gly Asn Asp Val Pro Val Val Val Tyr Ser Asp Ala Lys Lys
 705 710 715 720

Val Glu Leu Phe Phe Thr Pro Ala Ser Gly Gly Glu Gln Arg Ser Leu
 725 730 735

Gly Ala Lys Glu Phe Thr Glu Lys Lys Thr Thr Ala Gly Tyr Thr Tyr
 740 745 750

Gln Met Tyr Glu Gly Thr Gly Lys Ser Asn Thr Glu His Glu Asn Leu
 755 760 765

Tyr Met Thr Trp Met Val Pro Tyr Glu Ala Gly Thr Ile Thr Ala Lys
 770 775 780

Ala Trp Asp Lys Asp Gly Lys Glu Ile Thr Glu Asn Leu Gln Gly Arg
 785 790 795 800

Thr Ser Val Thr Thr Ala Gly Glu Ala Lys Lys Leu Lys Val Asp Val
 805 810 815

Asp Arg Thr Lys Ile Thr Ala Asn Gly Glu Asp Leu Ser Tyr Leu Thr
 820 825 830

Val Ser Val Thr Asp Asp Lys Gly Asn Leu Val Pro Asn Ala Asp Asn
 835 840 845

Lys Val Thr Phe Glu Val Ser Gly Asp Gly Val Leu Ala Gly Val Asp
 850 855 860

Asn Gly Arg Pro Val Asp His Gln Ser Tyr Arg Asp Asp Asn Arg Lys
 865 870 875 880

Ala Phe Ser Gly Gln Leu Val Gly Ile Val Gln Ser Thr Lys Ser Ala
 885 890 895

Gly Thr Ile Thr Val Lys Val Lys Ala Glu Gly Met Glu Asp Gln Thr
 900 905 910

Val Thr Ile Thr Thr Thr Pro Ser Ser Asp Ser Ser Glu Ser Lys Lys
 915 920 925

ES 2 591 359 T3

Ala Ile Ser Ser Val Lys Met Ser Lys Ser Tyr Tyr Val Lys Val Gly
 930 935 940

Asn Gln Pro Gln Leu Pro Gly Gln Val Glu Val Val Leu Thr Asp Lys
 945 950 955 960

Thr Lys Thr Thr Gly Thr Val Thr Trp Glu Lys Ala Thr Ala Glu Gln
 965 970 975

Ile Gly Gln Ala Gly Thr Phe Ser Leu Thr Gly Thr Val Ser Val Glu
 980 985 990

Gly Val Glu Lys Ala Glu Thr Val Ser Val Asn Val Asn Met Ile Asp
 995 1000 1005

Thr Val Ala Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Thr Thr Thr Ser Val Gly
 1010 1015 1020

Val Ala Pro Ser Leu Pro Thr Ser Arg Pro Ala Val Met Glu Asp
 1025 1030 1035

Gly Thr Val Leu Thr Ala Ala Phe Pro Val Lys Trp Glu Ala Pro
 1040 1045 1050

Glu Lys Gly Tyr Asp Ala Glu Gly Ile Val Asn Val Thr Gly Thr
 1055 1060 1065

Ala Asp Val Phe Gly Glu Ser Met Pro Val Thr Ala Thr Val Arg
 1070 1075 1080

Val Gln Glu Ala Glu Tyr Thr Val Gly Asn Asn Val Ala Lys Glu
 1085 1090 1095

Ala Met Thr Leu Ser Gln Asp Ile Pro Gln Glu Met Gln Ser Asp
 1100 1105 1110

Asp Leu Glu Ala Ile Arg Asp Gly Asn Arg Thr Val Asp Gly Asn
 1115 1120 1125

Gln Gly Gly Asn Thr Asn Ser Thr Met Trp Ser Asn Tyr Lys Asn
 1130 1135 1140

Ser Lys Asp Ala Lys Asp Asn Asp Ala Asp Ile Thr Phe Gln Tyr
 1145 1150 1155

ES 2 591 359 T3

Ala Thr Gln Gln Ile Phe Asn Gln Ile Lys Ile Phe Phe Arg Ser
 1160 1165 1170

Asp Ser His Ala Ala Ser Tyr Pro Ala Asp Asn Thr Thr Lys Ile
 1175 1180 1185

Tyr Val Ser Glu Thr Gly Glu Glu Gly Thr Trp Thr Glu Val Thr
 1190 1195 1200

Ala Thr Glu Ser His Pro Glu Glu Leu Pro Ala Ile Gly Val Val
 1205 1210 1215

Glu Tyr Thr Tyr Asp Phe Val Pro Thr Lys Ala Val Phe Val Lys
 1220 1225 1230

Ile His Val Val Asn Asn Pro Asp Ala Ser Gly Lys Gly Gly Gly
 1235 1240 1245

Phe Thr Cys Thr Gly Ile Val Glu Ala Glu Leu Tyr Leu Ala Asn
 1250 1255 1260

Gln Ala Asp Phe Thr Thr Asn Thr Thr Ala Lys Leu Glu Ser Leu
 1265 1270 1275

Lys Ile Asn Glu Thr Ser Ala Pro Ala Glu Val Leu Ala Ala Gly
 1280 1285 1290

Ala Gly Ser Trp Gly Thr Lys Glu Val Glu Ala Lys Thr Val Glu
 1295 1300 1305

Ala Val Gly Ala Asp Asn Ala Ala Val Thr Val Leu Pro Thr Tyr
 1310 1315 1320

Glu Asn Ala Val Arg Ile Ile Ile Glu Ser Glu Asp His Lys Thr
 1325 1330 1335

Thr Asn Thr Phe Val Val Asn Leu Asp Ala Asp Ala Thr Asp Asp
 1340 1345 1350

Ser Lys Asp Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Thr Ser Thr Val Gly Ser
 1355 1360 1365

Ala Gln Ser Gly Asn Glu Lys Glu Lys Ala Phe Asp Gly Asp Thr
 1370 1375 1380

Asn Thr Leu Trp His Thr Gln Trp Asn Asn Thr Asn Pro Ala Glu

ES 2 591 359 T3

1385						1390						1395
Arg Trp	Ile Glu Met	Glu Leu	Glu Asp Val	Gln Asn	Val Ile Gly							
1400		1405		1410								
Leu Arg	Tyr Leu Pro Arg	Gln Asn Gly Gly	Gln Asn	Gly Ile Val								
1415		1420		1425								
Lys Thr	Tyr Lys Ile Glu	Val Lys Ala Ala	Glu Gly	Asp Glu Trp								
1430		1435		1440								
Lys Glu	Val Ala Val Thr	Glu Gly Thr Lys	Val Trp	Ala Val Asp								
1445		1450		1455								
Asn Thr	Trp Lys Met Ala	Lys Phe Glu Thr	Pro Val	Gln Ala Lys								
1460		1465		1470								
Tyr Ile	Arg Phe Ser Gly	Val Glu Thr His	Asp Asp	Gln Gly Gly								
1475		1480		1485								
Asn Lys	Trp Met Ser Ala	Ala Glu Ile Arg	Val Lys	Val Thr Lys								
1490		1495		1500								
Glu Glu	Val Val Pro Pro	Thr Ala Thr Glu	Leu Ser	Leu Lys Ala								
1505		1510		1515								
Gln Pro	Thr Lys Thr Ala	Tyr Ala Val Gly	Glu Lys	Phe Asp Pro								
1520		1525		1530								
Ala Gly	Leu Val Ile Gly	Val Lys Tyr Ser	Asp Gly	Thr Glu Lys								
1535		1540		1545								
Glu Val	Ala Tyr Gly Gln	Asp Asn Ala Gly	Glu Phe	Thr Phe Asn								
1550		1555		1560								
Pro Thr	Leu Ser Thr Ala	Leu Thr Lys Asp	Tyr Thr	Lys Val Glu								
1565		1570		1575								
Val Gly	Tyr Ala Gly Leu	Lys Leu Asp Val	Asn Ile	Thr Val Ser								
1580		1585		1590								
Glu Ser	Glu Pro Val Ile	Pro Glu Ala Leu	Glu Val	Val Ser Ala								
1595		1600		1605								
Pro Ala	Lys Thr Glu Tyr	Glu Glu Gly Glu	Met Phe	Asn Pro Ala								
1610		1615		1620								

ES 2 591 359 T3

Gly	Leu	Ser	Val	Lys	Ile	Lys	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Gly	Asp
	1625					1630					1635			
Glu	Val	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ala	Asn	Ala	Asp	Gln	Phe	Thr	Phe	Asn
	1640					1645					1650			
Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Ala	Leu	Lys	Thr	Ser	Asp	Glu	Lys	Val	Thr
	1655					1660					1665			
Val	Thr	Tyr	Ala	Glu	Lys	Thr	Ala	Asp	Ile	Lys	Ile	Lys	Val	Asn
	1670					1675					1680			
Lys	Lys	Thr	Pro	Val	Val	Pro	Glu	Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Lys	Val
	1685					1690					1695			
Glu	Ile	Lys	Ala	Asn	Pro	Ala	Lys	Thr	Glu	Tyr	Lys	Glu	Gly	Asp
	1700					1705					1710			
Lys	Phe	Asp	Pro	Thr	Gly	Leu	Val	Leu	Thr	Val	Lys	Tyr	Asp	Lys
	1715					1720					1725			
Gly	Glu	Asp	Lys	Glu	Val	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Thr	Lys	Ala	Asp
	1730					1735					1740			
Phe	Thr	Phe	Ile	Pro	Ser	Leu	Asp	Thr	Ala	Leu	Lys	Thr	Ser	Asp
	1745					1750					1755			
Glu	Lys	Val	Thr	Val	Thr	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Ala	Glu	Ile	Gly
	1760					1765					1770			
Ile	Glu	Val	Lys	Ala	Asp	Thr	Pro	Val	Glu	Pro	Glu	Lys	Pro	Thr
	1775					1780					1785			
Val	Asp	Lys	Ile	Ala	Val	Lys	Lys	Val	Pro	Ala	Lys	Thr	Thr	Tyr
	1790					1795					1800			
Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Phe	Asp	Pro	Ser	Gly	Leu	Val	Leu	Thr	Val
	1805					1810					1815			
Thr	Met	Ser	Asp	Lys	Thr	Thr	Lys	Glu	Val	Ala	Tyr	Gly	Asn	Glu
	1820					1825					1830			
Thr	Ala	Lys	Asp	Phe	Val	Phe	Asn	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Ala	Leu
	1835					1840					1845			

ES 2 591 359 T3

Thr Glu Gly Met Asn Lys Val Asp Val Thr Tyr Ala Gly Lys Thr
1850 1855 1860

Val Asp Ile Gly Ile Glu Val Lys Ala Asp Thr Pro Val Glu Pro
1865 1870 1875

Glu Lys Pro Thr Val Glu Lys Val Glu Ile Lys Ala Asn Pro Ala
1880 1885 1890

Lys Thr Glu Tyr Lys Ala Gly Glu Thr Phe Asp Pro Thr Gly Met
1895 1900 1905

Ser Leu Thr Val Thr Met Ser Asp Gly Thr Thr Lys Val Val Ala
1910 1915 1920

Tyr Gly Pro Glu Thr Ala Lys Asp Phe Ser Phe Asn Pro Ser Leu
1925 1930 1935

Asn Thr Lys Leu Thr Ala Asp Thr Lys Lys Val Thr Val Thr Tyr
1940 1945 1950

Gly Gly Gln Ser Ala Asp Val Ala Val Ser Val Lys Ala Asp Pro
1955 1960 1965

Ser Glu Asp Lys Lys Pro Asn Thr Glu Lys Pro Asp Lys Gly Gly
1970 1975 1980

Ala Val Gln Thr Gly Asp Asn Phe Asn Val Thr Leu Leu Ile Gly
1985 1990 1995

Leu Val Val Leu Ala Gly Ala Val Ala Gly Gly Ala Ala Leu Thr
2000 2005 2010

Ile Phe Lys Arg Asn Lys Arg Lys
2015 2020

<210> 6

< 211> 1355

< 212> PRT

< 213> Clostridium perfringens

5

<400> 6

Met Gln Ser Phe Asn Lys Arg Gly Thr Ala Leu Gly Ala Ala Ile Ala
1 5 10 15

Phe Ala Leu Thr Leu Ala Pro Thr Leu Val Met Ala Glu Thr Arg Gln

ES 2 591 359 T3

	20	25	30
Ile Pro Glu Ser Glu Thr Val Asn Val Gly Phe Ile Lys Asp Gly Glu	35	40	45
Arg Ser Thr Ile Phe Asn Gln Asn Trp Lys Phe Phe Lys Gly Asp Pro	50	55	60
Ser Gly Ala Glu Gly Val Asp Phe Asp Asp Ser Ser Trp Arg Gly Leu	65	70	75
Asn Leu Pro His Asp Trp Ser Ile Glu Gly Asp Phe Thr Val Glu Gly	85	90	95
Glu Ala Glu Ser Gly Phe Leu Leu Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys	100	105	110
Ala Phe Val Val Pro Glu Lys Tyr Asn Ser Lys Asp Phe Thr Leu Asn	115	120	125
Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn Ala Glu Val Tyr Val Asn Gly Lys Lys	130	135	140
Val Gly Glu His Asn Tyr Gly Tyr Thr Ser Phe Ala Phe Asp Ile Thr	145	150	155
Glu Ala Leu Ile Cys Asp Gly Gln Thr Glu Asn Ile Ile Ala Val Lys	165	170	175
Val Ser Asn Pro Val Pro Thr Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile	180	185	190
Tyr Arg Asp Val Thr Leu Ser Val Thr Asp Ser Ile His Val Ala His	195	200	205
Ser Gly Thr Thr Val Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gln Lys Gly Gly	210	215	220
Asp Val Asp Val Ala Ile Glu Thr Ile Val Glu Asn Glu Ser Lys Asp	225	230	235
Asn Ser Met Val Thr Val Lys Ser Thr Val Val Asn Ser Lys Gly Glu	245	250	255
Glu Val Ser Glu Ala Val Ile Asn Glu Gln Ser Ile Gly Val Asn Glu	260	265	270

ES 2 591 359 T3

Ser Tyr Thr Phe Lys Gln Thr Ala Ile Val Asn Asn Pro Asp Leu Trp
 275 280 285

Ser Val Asp Asn Pro Asn Met Tyr Lys Val Lys Ser Glu Val Leu Leu
 290 295 300

Asp Gly Lys Val Ile Asp Thr Tyr Phe Thr Asp Phe Gly Phe Arg Tyr
 305 310 315 320

Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Thr Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Asn Met
 325 330 335

Lys Leu Lys Gly Val Cys Met His His Asp Gln Gly Ala Leu Gly Ala
 340 345 350

Ala Ser Tyr Tyr Arg Ala Val Glu Arg Gln Met Glu Lys Met Lys Glu
 355 360 365

Met Gly Val Asn Ala Ile Arg Val Ser His Asn Pro Ala Ser Glu Met
 370 375 380

Leu Leu Glu Ile Cys Asn Arg Leu Gly Leu Leu Val Ile Asn Glu Ala
 385 390 395 400

Phe Asp Thr Trp Thr Asn Pro Lys Asn Gly Asn Val Asn Asp Phe Ser
 405 410 415

Lys Tyr Phe Asn Glu Val Ile Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Asn Gly
 420 425 430

Ser Pro Glu Met Thr Trp Gly Glu Phe Glu Ala Arg Ser Met Val Lys
 435 440 445

Asn Ser Lys Asn Asn Pro Ser Ile Ile Met Trp Ser Ile Gly Asn Glu
 450 455 460

Val Leu Glu Gly Ile Ser Gly Ser Ala Ser Asn Tyr Thr Asn Val Ala
 465 470 475 480

Gln Asn Ile Ile Asp Trp Ile Lys Asp Glu Asp Glu Thr Arg His Val
 485 490 495

Thr Ile Gly Asp Asn Arg Thr Lys Asn Gly Asp Arg Thr Ala Glu Ala
 500 505 510

ES 2 591 359 T3

Ile Ser Glu Val Val Asp Asp Asn Gly Gly Leu Val Gly Phe Asn Tyr
515 520 525

Ala Asn Glu Thr Gln Val Ala Gln Gln Arg Ala Asn His Pro Asp Trp
530 535 540

Thr Leu Tyr Ala Ser Glu Thr Ser Ser Ala Ile His Thr Arg Gly Tyr
545 550 555 560

Tyr Lys Thr Lys Gly Ile Asp Tyr Gly Asn His Arg Ile Ser Glu Tyr
565 570 575

Asp Asn Asn Gln Thr Lys Val Gly Trp Gly His Ser Ala Ser Asp Ala
580 585 590

Trp Lys Phe Val Ile Lys Asn Asp Tyr Asn Ala Gly Glu Leu Val Trp
595 600 605

Thr Gly Phe Asp Tyr Ile Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly
610 615 620

Thr Gly Thr Val Gly Gly Gly Asn Gly Ala Ala Pro Lys Ser Ser Tyr
625 630 635 640

Phe Gly Ile Val Asp Thr Ala Gly Phe Glu Lys Asp Ile Tyr Tyr Leu
645 650 655

Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp Asp Val Asn Thr Leu His Val Leu Pro
660 665 670

Thr Trp Asn Arg Glu Asp Ile Val Ile Glu Asn Gly Asn Val Glu Val
675 680 685

Asn Val Phe Thr Asp Ala His Lys Val Glu Leu Tyr Leu Asn Asp Lys
690 695 700

Lys Val Gly Glu Gln Thr Ser Thr Glu His Thr Thr Asp Ala Gly Tyr
705 710 715 720

Lys Tyr Tyr Thr Phe Gly Asn Asp Ser Leu Tyr Pro Val Phe Asn Val
725 730 735

Pro Tyr Glu Glu Gly Thr Leu Thr Ala Lys Ala Tyr Asp Lys Glu Gly
740 745 750

ES 2 591 359 T3

Asn Glu Ile Thr Asn Thr Glu Gly Arg Asn Thr Val Lys Thr Thr Gly
 755 760 765
 Glu Ala Ser Thr Val Arg Leu Ser Ala Asp Arg Asp Thr Ile Asp Ser
 770 775 780
 Asp Gly Tyr Asp Leu Ser Tyr Ile Thr Val Asp Ile Val Asp Glu Asp
 785 790 795 800
 Gly Asn Ile Val Gln Asn Ala Asp Asn Arg Leu Asn Phe Gln Leu Glu
 805 810 815
 Gly Asp Gly Lys Ile Val Gly Val Asp Asn Gly Asp Gln Thr Asp Thr
 820 825 830
 Asp Ser Tyr Lys Pro Thr Ser Asp Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ala Leu
 835 840 845
 Ser Gly Lys Ala Leu Val Ile Val Gln Ser Thr Lys Asp Ala Gly Asn
 850 855 860
 Ile Arg Leu Asn Val Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ser Gln Ser Ile Glu
 865 870 875 880
 Ile Asn Thr Val Asn Asn Ala Gly Glu Asp Lys Phe Leu Glu Ser Tyr
 885 890 895
 Glu Ile Val Lys Asp Tyr Tyr Val Asn Leu Asn Glu Lys Pro Glu Leu
 900 905 910
 Pro Ser Thr Val Glu Gly Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Thr Glu Thr Phe
 915 920 925
 Asn Ile Ser Trp Asn Asp Tyr Asp Glu Ser Gln Leu Asn Thr Pro Gln
 930 935 940
 Val Phe Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Gly Thr Asp Val Ala Val Asn
 945 950 955 960
 Val Asn Val His Val Ile Gly Asp Val Val Ser Met Glu Asn Tyr Ser
 965 970 975
 Thr Phe Thr Tyr Ala Gly Gln Thr Pro Thr Leu Pro Lys Thr Val Lys
 980 985 990
 Gly Tyr Leu Ala Asp Gly Asn Glu Ser Glu Glu Phe Lys Val Asp Trp

ES 2 591 359 T3

995			1000			1005								
Asn 1010	Leu 1010	Glu 1010	Gly 1010	Val 1010	Asp 1015	Phe 1015	Ser 1015	Glu 1015	Pro 1015	Asn 1020	Thr 1020	Thr 1020	Val 1020	Glu 1020
Val 1025	Leu 1025	Gly 1025	Glu 1025	Val 1025	Ser 1030	Leu 1030	Leu 1030	Gly 1030	Lys 1030	Thr 1035	Tyr 1035	Thr 1035	Val 1035	Thr 1035
Ser 1040	Thr 1040	Val 1040	Arg 1040	Val 1040	Val 1045	Glu 1045	Ala 1045	Leu 1045	Lys 1045	Ala 1050	Ala 1050	Ala 1050	Asn 1050	Leu 1050
Ala 1055	Ile 1055	Asn 1055	Asn 1055	Ser 1055	Ser 1060	Asn 1060	Lys 1060	Asp 1060	Val 1060	Pro 1065	Ala 1065	Leu 1065	Ser 1065	Gln 1065
Ser 1070	Cys 1070	Val 1070	Ser 1070	Thr 1070	Ala 1075	Asp 1075	Asn 1075	Leu 1075	Asn 1075	Ser 1080	Ile 1080	Asn 1080	Asn 1080	Gly 1080
Ile 1085	Thr 1085	Asn 1085	Asn 1085	Ser 1085	Ser 1090	Asn 1090	Thr 1090	Gly 1090	Glu 1090	Arg 1095	Trp 1095	Thr 1095	Asn 1095	Trp 1095
Asn 1100	Glu 1100	Arg 1100	Asn 1100	Leu 1100	Thr 1105	Glu 1105	Asn 1105	Gly 1105	Glu 1105	Pro 1110	Lys 1110	Gly 1110	Ala 1110	Tyr 1110
Val 1115	Gln 1115	Leu 1115	Asp 1115	Trp 1115	Lys 1120	Asn 1120	Lys 1120	Tyr 1120	Asn 1120	Ile 1125	Asp 1125	Arg 1125	Leu 1125	Asp 1125
Leu 1130	Trp 1130	Leu 1130	Phe 1130	Thr 1130	Asp 1135	Asn 1135	Ile 1135	Tyr 1135	Gly 1135	Arg 1140	Ile 1140	Pro 1140	Lys 1140	Lys 1140
Val 1145	Glu 1145	Ile 1145	Ser 1145	Tyr 1145	Lys 1150	Asn 1150	Glu 1150	Ala 1150	Gly 1150	Glu 1155	Tyr 1155	Glu 1155	Val 1155	Val 1155
Thr 1160	His 1160	Ser 1160	Asn 1160	Thr 1160	Thr 1165	Glu 1165	Val 1165	Ser 1165	Tyr 1165	Leu 1170	Ala 1170	Gly 1170	Glu 1170	Thr 1170
Thr 1175	Tyr 1175	Phe 1175	Leu 1175	Asp 1175	Lys 1180	Val 1180	Ile 1180	Asn 1180	Thr 1180	Asp 1185	Ser 1185	Ile 1185	Arg 1185	Val 1185
Tyr 1190	Met 1190	Gln 1190	Gln 1190	Pro 1190	Glu 1195	Val 1195	Gly 1195	Lys 1195	Cys 1195	Ile 1200	Gly 1200	Leu 1200	Ser 1200	Glu 1200
Val 1205	Ala 1205	Val 1205	Tyr 1205	Glu 1205	Tyr 1210	Val 1210	Pro 1210	Gln 1210	Val 1210	Ser 1215	Ala 1215	Asn 1215	Glu 1215	Gly 1215
Asn 1220	Lys 1220	Leu 1220	Ser 1220	Glu 1220	Ile 1225	Lys 1225	Leu 1225	Asp 1225	Gly 1225	Glu 1230	Ala 1230	Leu 1230	Glu 1230	Gly 1230

ES 2 591 359 T3

Phe Asn Pro Asp Thr Asn Glu Tyr Thr Val Asn Leu Lys Glu Leu
 1235 1240 1245

Pro Lys Thr Val Glu Ala Ser Gly Glu Glu Asn Val Ala Ile Thr
 1250 1255 1260

Ile Leu Pro Val His Asn Asn Lys Ser Ile Ile Ile Ala Arg Ser
 1265 1270 1275

Glu Ser Gly Ala Lys Asn Ile Tyr Thr Val Asn Tyr Val Leu Glu
 1280 1285 1290

Glu Ser Glu Gly Ser Ala Asp Ile Asn Glu Asp Gly Ser Ile Asn
 1295 1300 1305

Val Gly Asp Leu Ser Ile Val Ser Lys Tyr Gln Gly Glu Val Ile
 1310 1315 1320

Ser Gly Asn Ala Leu Ser Glu Lys Ser Asp Ile Asn Lys Asp Gly
 1325 1330 1335

Val Val Asp Lys Ala Asp Ile Gln Ile Val Met Gly Lys Ile Leu
 1340 1345 1350

Gly Glu
 1355

<210> 7

< 211> 1355

< 212> PRT

5

< 213> Clostridium perfringens

<400> 7

Met Gln Ser Phe Asn Lys Arg Gly Thr Ala Leu Gly Ala Ala Ile Ala
 1 5 10 15

Phe Ala Leu Thr Leu Ala Pro Thr Leu Val Met Ala Glu Thr Arg Gln
 20 25 30

Ile Pro Glu Ser Glu Thr Val Asn Val Gly Phe Ile Lys Asp Gly Glu
 35 40 45

Arg Ser Thr Ile Phe Asn Gln Asn Trp Lys Phe Phe Lys Gly Asp Pro
 50 55 60

ES 2 591 359 T3

Ser Gly Ala Glu Gly Val Asp Phe Asp Asp Ser Ser Trp Arg Gly Leu
65 70 75 80

Asn Leu Pro His Asp Trp Ser Ile Glu Gly Asp Phe Thr Val Glu Gly
85 90 95

Glu Ala Glu Ser Gly Phe Leu Leu Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys
100 105 110

Ala Phe Val Val Pro Glu Lys Tyr Asn Gly Lys Asp Phe Thr Leu Asn
115 120 125

Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn Ala Glu Val Tyr Val Asn Gly Lys Lys
130 135 140

Val Gly Glu His Asn Tyr Gly Tyr Thr Ser Phe Ala Phe Asp Ile Thr
145 150 155 160

Glu Ala Leu Ile Cys Asp Gly Gln Thr Glu Asn Ile Ile Ala Val Lys
165 170 175

Val Ser Asn Pro Val Pro Thr Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile
180 185 190

Tyr Arg Asp Val Thr Leu Ser Val Thr Asp Ser Ile His Val Ala His
195 200 205

Ala Gly Thr Thr Val Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gln Lys Asp Gly
210 215 220

Asp Val Asp Val Ala Ile Glu Thr Ile Val Glu Asn Glu Ser Lys Asp
225 230 235 240

Asn Ser Met Val Thr Val Lys Ser Thr Val Val Asn Ser Lys Gly Glu
245 250 255

Glu Val Ser Glu Ser Val Ile Asn Glu Lys Ser Ile Gly Ala Asn Glu
260 265 270

Ser Tyr Thr Phe Asn Gln Thr Ala Ile Val Asn Asn Pro Gly Leu Trp
275 280 285

Ser Val Asp Asn Pro Asn Met Tyr Lys Val Lys Ser Glu Val Leu Val
290 295 300

Asp Gly Asn Val Ile Asp Thr Tyr Phe Thr Asp Phe Gly Phe Arg Tyr

ES 2 591 359 T3

305		310	
Tyr Asn Phe Asp Lys Asp Thr Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Asn Ile			
Lys Leu Lys Gly Val Cys Met His His Asp Gln Gly Ala Leu Gly Ala			
Ala Ser Tyr Tyr Arg Ala Val Glu Arg Gln Met Glu Lys Met Lys Glu			
Met Gly Val Asn Ala Ile Arg Val Ser His Asn Pro Ala Ser Glu Met			
Leu Leu Glu Ile Cys Asn Arg Leu Gly Leu Leu Val Ile Asn Glu Ala			
Phe Asp Thr Trp Thr Asn Pro Lys Asn Gly Asn Val Asn Asp Phe Ser			
Lys Tyr Phe Asn Glu Val Ile Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Asn Gly			
Ser Pro Glu Met Thr Trp Gly Glu Phe Glu Ala Arg Ser Met Val Lys			
Asn Ser Lys Asn Asn Pro Ser Ile Ile Met Trp Ser Ile Gly Asn Glu			
Val Leu Glu Gly Ile Ser Gly Ser Ala Ser Asn Tyr Thr Asn Val Ala			
Gln Asn Ile Ile Asp Trp Ile Lys Asp Glu Asp Glu Thr Arg His Val			
Thr Ile Gly Asp Asn Arg Thr Lys Asn Gly Asp Arg Thr Ala Glu Ala			
Ile Ser Glu Val Val Asp Asp Asn Asp Gly Leu Val Gly Phe Asn Tyr			
Ala Asn Glu Ala Gln Val Ala Gln Gln Arg Ala Asn His Pro Asp Trp			
Thr Leu Tyr Ala Ser Glu Thr Ser Ser Ala Ile His Thr Arg Gly Tyr			

ES 2 591 359 T3

Tyr Lys Thr Lys Gly Ile Asp Tyr Ser Asn His Arg Ile Ser Glu Tyr
 565 570 575
 Asp Asn Asn Gln Thr Arg Val Gly Trp Gly His Ser Ala Ser Asp Ala
 580 585 590
 Trp Lys Phe Val Ile Lys Asn Asp Tyr Asn Ala Gly Glu Phe Val Trp
 595 600 605
 Thr Gly Phe Asp Tyr Ile Gly Glu Pro Thr Pro Trp Asn Gly Thr Gly
 610 615 620
 Thr Gly Thr Val Gly Gly Gly Asn Gly Ala Ala Pro Lys Ser Ser Tyr
 625 630 635 640
 Phe Gly Ile Val Asp Thr Ala Gly Phe Glu Lys Asp Ile Tyr Tyr Leu
 645 650 655
 Tyr Gln Ser Gln Trp Asn Asp Asp Val Asn Thr Leu His Val Leu Pro
 660 665 670
 Thr Trp Asn Arg Glu Asp Ile Val Ile Glu Asn Gly Asn Val Glu Val
 675 680 685
 Asn Val Phe Thr Asp Ala His Lys Val Glu Leu Tyr Leu Asn Asp Glu
 690 695 700
 Lys Ile Gly Glu Gln Thr Ser Thr Glu His Thr Thr Asp Ala Gly Tyr
 705 710 715 720
 Lys Tyr Tyr Thr Phe Gly Asn Asp Ser Leu Tyr Pro Val Phe Asn Val
 725 730 735
 Pro Tyr Lys Glu Gly Thr Leu Thr Ala Arg Ala Tyr Asp Lys Glu Gly
 740 745 750
 Asn Glu Ile Thr Asn Thr Glu Gly Arg Asn Thr Val Lys Thr Thr Gly
 755 760 765
 Glu Ala Ser Thr Val Arg Leu Ser Ala Asp Arg Asp Thr Ile Asp Ser
 770 775 780
 Asp Gly Tyr Asp Leu Ser Tyr Ile Thr Val Asp Ile Val Asp Glu Asn
 785 790 795 800

ES 2 591 359 T3

Gly Asn Ile Val Gln Asn Ala Asp Asn Arg Leu Asn Phe Glu Leu Glu
805 810 815

Gly Asn Gly Lys Ile Val Gly Val Asp Asn Gly Asp Gln Thr Asp Thr
820 825 830

Asp Ser Tyr Lys Pro Thr Ser Asp Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ala Leu
835 840 845

Ser Gly Lys Ala Leu Val Ile Val Gln Ser Thr Lys Asp Ala Gly Asn
850 855 860

Ile Arg Leu Asn Val Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ser Gln Ser Ile Glu
865 870 875 880

Ile Asn Thr Val Asn Asn Ala Gly Glu Asp Lys Phe Leu Glu Ser Tyr
885 890 895

Glu Ile Val Lys Asp Tyr Tyr Val Asn Leu Asn Glu Lys Pro Glu Leu
900 905 910

Pro Ser Thr Val Glu Gly Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Thr Glu Thr Phe
915 920 925

Asn Ile Ser Trp Asn Asp Tyr Asp Glu Ser Gln Leu Asn Thr Pro Gln
930 935 940

Val Phe Lys Ile Asn Gly Lys Leu Glu Gly Thr Asp Val Ala Val Asn
945 950 955 960

Val Asn Val His Val Ile Gly Asp Val Val Ser Met Glu Asn Tyr Ser
965 970 975

Thr Phe Thr Tyr Ala Gly Gln Thr Pro Thr Leu Pro Lys Thr Val Lys
980 985 990

Gly Tyr Leu Ala Asp Gly Asn Glu Ser Glu Glu Phe Lys Val Asp Trp
995 1000 1005

Asn Leu Glu Gly Val Asp Phe Ser Glu Pro Asn Thr Thr Val Glu
1010 1015 1020

Val Leu Gly Glu Val Ser Leu Leu Gly Lys Thr Tyr Thr Val Thr
1025 1030 1035

ES 2 591 359 T3

Ser Thr Val Arg Val Val Glu Ala Leu Lys Ala Ala Ala Asn Leu
 1040 1045 1050

Ala Ile Asn Lys Asp Thr Asn Lys Asp Val Pro Ala Leu Ser Gln
 1055 1060 1065

Ser Cys Val Ser Gln Ala Asp Asn Leu Asn Ser Ile Asn Asn Gly
 1070 1075 1080

Ile Thr Asn Asn Gly Thr Asp Thr Arg Glu Arg Trp Thr Asn Trp
 1085 1090 1095

Asn Glu Arg Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Pro Lys Gly Ala Tyr
 1100 1105 1110

Val Gln Leu Asp Trp Glu Asn Lys Tyr Asn Ile Asp Arg Leu Asp
 1115 1120 1125

Leu Trp Leu Phe Thr Asp Asn Ile Tyr Gly Arg Ile Pro Lys Lys
 1130 1135 1140

Val Glu Ile Ser Tyr Lys Asn Glu Ala Gly Glu Tyr Glu Val Val
 1145 1150 1155

Thr His Ser Asn Thr Thr Glu Val Ser Tyr Leu Ala Gly Glu Thr
 1160 1165 1170

Thr Tyr Phe Leu Asp Lys Val Ile Asn Thr Asp Ser Ile Arg Val
 1175 1180 1185

Tyr Met Gln Gln Pro Glu Val Gly Lys Cys Ile Gly Leu Ser Glu
 1190 1195 1200

Val Ala Val Tyr Glu Tyr Val Pro Gln Val Ser Ala Asn Glu Gly
 1205 1210 1215

Asn Lys Leu Ser Glu Ile Lys Leu Asp Gly Glu Ala Leu Glu Gly
 1220 1225 1230

Phe Asn Pro Asp Thr Asn Glu Tyr Thr Val Asn Leu Lys Glu Leu
 1235 1240 1245

Pro Lys Thr Val Glu Ala Ser Gly Glu Glu Asn Val Ala Ile Thr
 1250 1255 1260

Ile Leu Pro Val His Asn Asn Lys Ser Ile Ile Ile Ala Arg Ser

ES 2 591 359 T3

1265						1270										1275
Glu	Ser	Gly	Ala	Lys	Asn	Ile	Tyr	Thr	Val	Asn	Tyr	Val	Leu	Glu		
1280						1285					1290					
Glu	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Asp	Ile	Asn	Glu	Asp	Gly	Ser	Ile	Asn		
1295						1300					1305					
Val	Gly	Asp	Leu	Ser	Ile	Val	Ser	Lys	Tyr	Gln	Gly	Glu	Ile	Ile		
1310						1315					1320					
Ser	Gly	Asn	Ala	Leu	Ser	Glu	Lys	Ser	Asp	Ile	Asn	Lys	Asp	Gly		
1325						1330					1335					
Val	Val	Asp	Lys	Ala	Asp	Ile	Gln	Ile	Val	Met	Gly	Lys	Ile	Leu		
1340						1345					1350					
Gly	Glu															
1355																

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto lácteo que comprende:
 - a) proporcionar un sustrato a base de leche que comprende lactosa seleccionada entre leche entera, leche con poca grasa, leche desnatada, leche agria, leche en polvo reconstituida, leche condensada, soluciones de leche en polvo, leche UHT, suero de leche, permeado de suero de leche, suero de leche ácido y nata; y
 - b) tratar dicho sustrato con una enzima que tiene actividad lactasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a los aminoácidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2;

en donde la enzima cuando hidroliza la lactosa en el sustrato a base de leche, tiene una proporción de actividad lactasa frente a transgalactosilasa superior a 1:1, lo que reduce de este modo la cantidad de lactosa en el sustrato a base de leche en al menos un 70%.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la enzima se obtiene a partir de un microorganismo del género *Bifidobacterium*.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el pH óptimo de la actividad lactasa a 37°C es superior a pH 5, y en donde la actividad lactasa de la enzima a pH 5 es al menos 50% de su actividad lactasa a pH 6 cuando se mide a 37°C.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato a base de leche tiene una proporción de proteína frente a lactosa de al menos 0,2.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato a base de leche tratado con enzima representa al menos un 50% (peso/peso) del producto lácteo.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de al menos 50°C.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima se añade al sustrato a base de leche con una concentración inferior a 30 LAU por g de lactosa en el sustrato a base de leche, en donde 1 LAU es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de glucosa por minuto en tampón M a pH 6,5 y 37°C con una concentración de lactosa de 4,75% p/v.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima se añade al sustrato a base de leche con una concentración inferior a 1000 LAU por litro de sustrato a base de leche, en donde 1 LAU es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de glucosa por minuto en tampón M a pH 6,5 y 37°C con una concentración de lactosa de 4,75% p/v.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa de c) fermentar dicho sustrato con un microorganismo, en donde el producto lácteo es un producto lácteo fermentado.
10. El método según la reivindicación 9, en el que el producto lácteo fermentado es yogur.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que la etapa b) y la etapa c) se realizan esencialmente al mismo tiempo.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que la enzima de la etapa b) y el microorganismo de la etapa c) se añaden al sustrato a base de leche esencialmente al mismo tiempo.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que menos del 80% de la lactosa se ha hidrolizado después de dos horas de fermentación, y en el que más del 90% de la lactosa se ha hidrolizado en el producto lácteo fermentado final.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la etapa b) tiene lugar a una temperatura de al menos 60°C.
15. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima que tiene actividad lactasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 28-1331 de SEQ ID NO: 2.