

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 041**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/18** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2010 PCT/IB2010/055057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11061657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2010 E 10784586 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2501242**

54 Título: **Procedimiento para producir leche en polvo**

30 Prioridad:

**17.11.2009 GB 0920089**  
**18.11.2009 US 262285 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.12.2017**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**  
**(100.0%)**  
**Langebrogade 1**  
**1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**LARSEN, NIELS ERIK y**  
**SØE, JØRN BORCH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 645 041 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

Procedimiento para producir leche en polvo

**Campo de la invención**

5 La presente invención se relaciona con un procedimiento para producir leche en polvo, una leche en polvo tratada con enzimas y usos de una enzima para el tratamiento de leche en polvo para brindar ventajas técnicas nuevas e inesperadas.

**Antecedentes de la invención**

10 La leche en polvo (también denominada en la presente «leche deshidratada») es un producto lácteo fabricado producido mediante la deshidratación de la leche. El objetivo principal de deshidratar es aumentar su vida útil y evitar la necesidad de refrigeración debido al bajo contenido de humedad. La leche en polvo y los productos lácteos en polvo pueden comprender leche entera deshidratada, leche descremada deshidratada, suero de leche deshidratado, productos a base de lactosuero seco y mezclas lácteas secas.

15 Típicamente, la leche en polvo se produce mediante el secado por pulverización de leche descremada sin grasa, leche entera, suero de leche o lactosuero. La leche pasteurizada se concentra en primer lugar en un evaporador a aproximadamente un 50% de sólidos de leche. La leche concentrada resultante se pulveriza en una cámara caliente donde el agua se evapora casi instantáneamente, dejando partículas finas de sólidos de leche pulverizados. Las partículas de polvo se separan del flujo de aire y se recuperan en el fondo del secador mientras que el aire húmedo sale del evaporador.

20 Alternativamente, la leche se puede secar mediante secado con tambor (también conocido como secado con rodillo). La leche se aplica como una película fina en la superficie del tambor caliente (típicamente calentado con vapor). El agua evaporada se extrae dejando sólidos de leche seca que forman una capa en el tambor que posteriormente se desecha. La leche en polvo producida de esta forma tiende a tener un sabor «cocido», debido a la caramelización causada por una mayor exposición al calor.

25 Otro proceso utilizado para producir leche en polvo es mediante el secado por congelación, el cual preserva muchos nutrientes en la leche, en comparación con el secado con tambor. Sin embargo, este procedimiento es generalmente más costoso que el secado con tambor o por pulverización.

Los productos de leche en polvo y los procesos utilizados para producirlos se describen en términos generales en "Milk and Dairy Products", R. Jost, publ. Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

30 WO 2006/066590 describe un procedimiento para producir una leche en polvo utilizando fosfolipasas, en particular fosfolipasa A. Sin embargo, este documento no divulga o sugiere que producir polvo de leche utilizando esta enzima evitaría ensuciar el equipo utilizado en el procedimiento.

Las lípido aciltransferasas son conocidos por ser ventajosos en las aplicaciones alimenticias. Se ha descubierto que las lípido aciltransferasas tienen actividad aciltransferasa significativa en alimentos. Esta actividad tiene aplicaciones beneficiosas sorprendentes en procedimientos para preparar alimentos.

35 Por ejemplo, WO 2004/064537 divulga un procedimiento para la producción *in situ* de un emulsionante mediante el uso de una lípido aciltransferasa y las ventajas asociadas con ella.

WO 2008/090395 se refiere a la expresión de lípido aciltransferasas en una célula huésped (heteróloga).

WO 2009/024862 describe un procedimiento para fabricar leche UHT utilizando una lípido aciltransferasa y leche producida mediante este procedimiento.

40 Los constituyentes principales de la leche son agua, grasa, proteínas, lactosa (azúcar de la leche) y minerales (sales). La leche también contiene cantidades menores de otras sustancias como pigmentos, enzimas, vitaminas, fosfolípidos (sustancias con propiedades tipo grasa), esteroides y gases.

45 Los lípidos de la leche, que en conjunto forman la «grasa láctea», tienen una composición y estructura muy complicadas, aún más complicadas que otras grasas naturales. Típicamente, la grasa láctea consiste de triglicéridos, di y monoglicéridos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides y vitaminas (A, D, E y K). Otros componentes incluyen fosfolípidos, lipoproteínas, glicéridos, cerebrósidos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, metales y agua.

50 Los fosfolípidos son la clase más activa en la superficie, dado que son anfipolares. Dado que el tamaño molecular es relativamente grande, tienden a formar bicapas lamelares. Los fosfolípidos de la leche se ven generalmente en conexión cercana con proteínas, especialmente cuando se ubican en las membranas de los glóbulos grasos de la leche. El constituyente principal de los fosfolípidos en la leche comprende lecitinas, las cuales son activas en superficie a una hidrofiliencia moderada. Por lo tanto, se puede ver a la lecitina como un agente suspensor y dispersante o como un emulsionante para emulsiones O/W así como para emulsiones W/O.

Los fosfolípidos comprenden entre un 0,8 y un 1,0% de la grasa láctea natural. Los tipos principales de fosfolípidos/lecitina en leche son fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

5 Los esteroides son altamente insolubles en agua, y muestran muy poca actividad en superficie. Se asocian fácilmente con fosfolípidos. El colesterol se puede considerar un ingrediente indeseado en la leche cuando se considera el valor nutricional de la leche. El colesterol comprende entre un 0,3 y un 0,4% de la grasa láctea natural.

### Sumario de la invención

Los aspectos de la presente invención están presentados en las reivindicaciones y en el siguiente comentario.

10 Sorprendentemente, se ha descubierto que exponer la leche o una fracción de ella a una lipasa durante la producción de leche en polvo resulta en que la leche en polvo tenga mejor fluido y propiedades de rehidratación, y también resulta en que la leche en polvo tenga menor contenido de ácido graso libre (en comparación con la leche en polvo, la cual durante su fabricación, ha sido tratada con fosfolipasa) y menor contenido de colesterol.

De conformidad con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir leche en polvo, donde dicho procedimiento comprende:

(a) poner en contacto la leche o una fracción de esta con una enzima lipasa; y

15 (b) secar la leche tratada con enzima para producir leche en polvo.

De conformidad con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona leche en polvo obtenida o que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención.

De conformidad con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un producto lácteo producido mediante la rehidratación de leche en polvo de la invención.

20 De conformidad con un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona un uso de una lipasa en la fabricación de leche en polvo para mejorar las propiedades de rehidratación de la leche en polvo. En un aspecto, dichas propiedades de rehidratación mejoradas de la leche en polvo comprenden una humectabilidad mejorada y/o menor tiempo de humectación.

25 De conformidad con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una lipasa en la fabricación de leche en polvo para reducir el contenido de colesterol de la leche en polvo.

De conformidad con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una lipasa en la fabricación de leche en polvo para reducir el contenido de ácido graso libre de la leche en polvo en comparación con la leche en polvo que, durante su fabricación, ha sido tratada con una fosfolipasa.

30 Una reducción del colesterol se puede medir mediante Cromatografía de capa fina (TLC) y/o Cromatografía gas líquido (GLC).

De conformidad con un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de una lipasa en la fabricación de leche en polvo para mejorar el fluido de la leche en polvo.

De conformidad con un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una lipasa en la fabricación de leche en polvo para reducir la suciedad del equipo utilizado en la fabricación de la leche en polvo.

### 35 Descripción detallada de realizaciones preferidas

Como se describió anteriormente, en un aspecto, la presente invención comprende un procedimiento para producir leche en polvo, el cual comprende: (A) poner en contacto la leche o una fracción de esta con una enzima lipasa; y (b) secar la leche tratada con enzima para producir leche en polvo.

Leche

40 El término «leche» como se utiliza en la presente puede comprender leche de origen animal o vegetal, e incluye leche entera, leche descremada, y leche semi-descremada.

45 Es posible utilizar leche de fuentes animales como búfalo, vaca (tradicional), oveja, cabra, etc., de forma individual o combinada. Las leches vegetales como leche de soja también se pueden utilizar, solas o en combinación con la leche animal. Cuando se utilizan leches vegetales en combinación con leche animal, la combinación comprende, típicamente, un bajo porcentaje (de leche vegetal), es decir, debajo del 15%, o debajo del 20% o debajo del 25% v/v. El término leche no comprende preferentemente queso de leche o crema de leche.

El término «consiste fundamentalmente» como se utiliza en la presente, cuando se refiere a un producto o a una composición, significa preferentemente que el producto o la composición pueden consistir de otros productos u otras composiciones pero únicamente a una concentración máxima de, preferentemente, un 10%, como un 5%, un

3%, un 2%, o un 1%, o un 0,5% o un 0,1%.

Para la modificación enzimática de la leche y/o crema, por ejemplo, puede ser preferible utilizar una temperatura menor a aproximadamente 30°C, por ejemplo, menor a 20°C, por ejemplo, menor a 10°C, por ejemplo. Se pueden utilizar las temperaturas adecuadas de entre 1 y 30°C, como por ejemplo, entre 3 y 20°C, por ejemplo, entre 1 y 10°C.

5 Incubación

La leche entra en contacto de conformidad con la presente invención con una enzima lípido aciltransferasa de forma tal que la enzima se incuba con ella. Las enzimas lípido aciltransferasas adecuadas se describen con más detalle en la presente.

10 La lípido aciltransferasa entra en contacto con la leche y se incuba con ella a una temperatura entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 70°C. En una realización, la lípido aciltransferasa entra en contacto con la leche y se incuba con ella a una temperatura entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 60°C, más preferentemente entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 50°C, aún más preferentemente entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 45°C, y más preferentemente, aproximadamente 40°C. En otra  
15 realización, la lípido aciltransferasa entra en contacto con la leche y se incuba con ella a una temperatura entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 20°C, más preferentemente entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 15°C y aún más preferentemente, entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 10°C.

Preferentemente, la lípido aciltransferasa entra en contacto con la leche y se incuba con ella a una concentración de aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 mg de enzima /kg de leche, más preferentemente entre  
20 aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,05 mg de enzima /kg de leche, aún más preferentemente entre 0,01 y aproximadamente 0,2 mg de enzima / kg de leche, aún más preferentemente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 0,1 mg de enzima / kg de leche, aún más preferentemente entre 0,01 y 0,05 mg de enzima / kg de leche y aún más preferentemente aproximadamente 0,05 mg de enzima / kg de leche.

Preferentemente, el tiempo de incubación es efectivo para garantizar que exista al menos un 10% de actividad transferasa, más preferentemente al menos un 15%, un 20%, un 25%, un 26%, un 28%, un 30%, un 40%, un 50%, un  
25 60% o un 70% de actividad transferasa.

La actividad transferasa se mide mediante el Ensayo de transferasa mencionado en la presente.

El tiempo de incubación puede ser de 1 minuto hasta 36 horas, preferentemente de 2 minutos hasta 24 horas, más preferentemente, de 5 minutos hasta 18 horas, aún más preferentemente de 10 minutos hasta 12 horas, y aún más preferentemente de 20 minutos hasta 8 horas.

30 En una realización, el tiempo de incubación puede oscilar entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 2 horas, preferentemente entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 1 hora, más preferentemente entre aproximadamente 35 minutos y aproximadamente 45 minutos.

En otra realización, el tiempo de incubación puede oscilar entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 36 horas, preferentemente entre aproximadamente 4 horas y aproximadamente 24 horas.

35 Preferentemente, la combinación de temperatura y el tiempo de incubación es efectiva para garantizar que exista al menos un 5% de actividad transferasa, preferentemente al menos un 10% de actividad transferasa, preferentemente al menos un 15%, un 20%, un 25%, un 25%, un 26%, un 28%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60% o un 75% de actividad transferasa.

Adecuadamente, el procedimiento comprende una etapa para remover la enzima y/o desnaturalizar la enzima.

40 Adecuadamente, la enzima para uso en la presente invención puede ser una enzima inmovilizada.

La reacción puede tener lugar en un recipiente adecuado, cuyos ejemplos no limitantes incluyen un reactor de flujo continuo.

Secado

45 Tras el tratamiento con una enzima aciltransferasa como se describe en la presente, la leche tratada se seca para producir leche en polvo.

En una realización, la leche tratada con enzima se seca mediante secado por pulverización para producir leche en polvo. Las condiciones adecuadas de secado por pulverización se describen en términos generales en "Milk and Dairy Products", R. Jost, publ. Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

50 En esta realización, la leche tratada con enzima se coloca adecuadamente en el secador por pulverización a una temperatura que oscila entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 95°C, preferentemente entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 95°C, más preferentemente entre aproximadamente 60°C y

aproximadamente 80°C. En una realización alternativa, le leche tratada con enzima se coloca adecuadamente en el secador por pulverización a una temperatura que oscila entre 35°C y 45°C, preferentemente aproximadamente 40°C.

5 En esta realización, la temperatura del aire de salida del secador por pulverización oscila, adecuadamente, entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 150°C, preferentemente entre aproximadamente 70°C y aproximadamente 130°C, más preferentemente entre aproximadamente 90°C y aproximadamente 110°C, y más preferentemente aproximadamente 100°C.

10 En esta realización, la temperatura de salida del producto del secador por pulverización oscila, adecuadamente, entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 80°C, preferentemente entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 70°C, más preferentemente entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 45°C, y más preferentemente aproximadamente 40°C.

En otra realización, la leche tratada con enzima se seca mediante secado por rodillo (también conocido como secado con tambor) para producir leche en polvo. Las condiciones adecuadas de secado por rodillo se describen en términos generales en "Milk and Dairy Products", R. Jost, publ. Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

15 En esta realización, la temperatura del tambor oscila, adecuadamente, entre aproximadamente 90°C y aproximadamente 150°C, más preferentemente entre aproximadamente 100°C y aproximadamente 130°C.

#### Ventajas

20 Una ventaja sorprendente conferida por la presente invención es las propiedades de rehidratación ampliamente mejoradas de la leche en polvo. En un aspecto, dichas propiedades de rehidratación mejoradas de la leche en polvo comprenden una humectabilidad mejorada y/o menor tiempo de humectación. La humectabilidad se puede medir de conformidad con el procedimiento IDF 87:1979.

25 Otra ventaja de la presente invención puede ser la reducción de la suciedad de la planta de procesamiento de la leche (p.ej., las tuberías de la planta y/o las superficies de acero) cuando se utiliza la leche en polvo tratada de conformidad con la presente invención en comparación con la leche en polvo que no ha sido tratada enzimáticamente y/o en comparación con la leche en polvo que, durante su fabricación, ha sido tratada con una fosfolipasa (en particular una enzima fosfolipasa A1 clasificada como E.C. 3.1.1.32 o una enzima fosfolipasa A2 clasificada como EC.3.1.1.4) (en lugar de la lípido aciltransferasa como se describe en la presente).

30 Otra ventaja de la presente invención puede ser una reducción en ácidos grasos libres en leche en polvo tratada de conformidad con la presente invención en comparación con leche en polvo que, durante su fabricación, ha sido tratada con una fosfolipasa (en particular una enzima fosfolipasa A1 clasificada como E.C. 3.1.1.32 o una enzima fosfolipasa A2 clasificada como EC.3.1.1.4) (en lugar de la lípido aciltransferasa como se describe en la presente).

Otra ventaja de la presente invención es una reducción en el contenido de colesterol en la leche en polvo, lo cual puede tener beneficios principales en la salud.

Otra ventaja de la presente invención es el fluido mejorado de la leche en polvo.

35 Adecuadamente, la mejora en las propiedades de rehidratación y/o la mejora en la diferencia sensorial perceptible y/o la mejora en el olor y/o gusto y/o la reducción en el contenido de colesterol y/o el mejor fluido de la leche en polvo y/o menor suciedad del equipo utilizado en su fabricación significa una mejora cuando la leche tratada enzimáticamente (tratada con enzimas de conformidad con la presente invención) se compara con leche en polvo que no ha sido tratada enzimáticamente y/o en comparación con la leche en polvo que ha sido tratada con fosfolipasa (en particular ya sea una enzima fosfolipasa A1 clasificada como E.C. 3.1.1.32 o una enzima fosfolipasa A2 clasificada como EC.3.1.1.4).

45 Adecuadamente, la mejora en las propiedades de rehidratación y/o la mejora en la diferencia sensorial perceptible y/o la mejora en el olor y/o gusto y/o la reducción en el contenido de colesterol y/o el mejor fluido de la leche en polvo y/o menor suciedad del equipo utilizado en su fabricación significa una mejora cuando la leche tratada enzimáticamente (tratada con enzimas de conformidad con la presente invención) se compara con leche en polvo que ha sido tratada con una o más de las siguientes fosfolipasas: Fosfolipasa A1 de *Fusarium oxysporum* (Lipopan F™) y/o una fosfolipasa de *Fusarium heterosporum* y/o fosfolipasa A1 de *Fusarium venenatum* (YieldMax™) y/o fosfolipasa de *Aspergillus niger* y/o fosfolipasa A2 de *Streptomyces violaceoruber* y/o fosfolipasa A2 de páncreas porcino y/o fosfolipasa A2 de *Tuber borchii*.

#### Célula huésped

50 El organismo huésped puede ser un organismo procariota o eucariota.

En una realización de la presente invención, la lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención se expresa en una célula huésped, por ejemplo, células bacterianas como *Bacillus* spp, por ejemplo, una célula huésped *Bacillus licheniformis*.

Las células huésped alternativas pueden ser hongos, levaduras, o plantas, por ejemplo.

Se ha descubierto que el uso de una célula huésped *Bacillus licheniformis* resulta en mayor expresión de una lípido aciltransferasa cuando se compara con otros organismos, como *Bacillus subtilis*.

5 Una lípido aciltransferasa *Aeromonas salmonicida* se ha insertado en un número de vectores de expresión convencionales, diseñados para ser óptimos para la expresión en *Bacillus subtilis*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus tubigensis*, respectivamente. Sin embargo, se detectaron niveles muy bajos en *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus tubigensis*. Los niveles de expresión fueron menores que 1 µg/ml, y no fue posible seleccionar células que produjeron proteína suficiente para iniciar una producción comercial (los resultados no se muestran). Por el contrario, *Bacillus licheniformis* pudo producir niveles proteicos que son atractivos para la producción económicamente factible.

10 En particular, se ha descubierto que la expresión en *B. licheniformis* es aproximadamente 100 veces mayor que la expresión en *B. subtilis* bajo el control del promotor aprE o es aproximadamente 100 veces mayor que la expresión en *S. lividans* bajo el control de un promotor A4 y fusionada con celulosa (los resultados no se muestran en la presente).

15 La célula huésped puede ser cualquier célula *Bacillus* diferente de *B. subtilis*. Preferentemente, dicha célula huésped *Bacillus* es una de las siguientes especies: *Bacillus licheniformis*; *B. alkalophilus*; *B. amyloliquefaciens*; *B. circulans*; *B. clausii*; *B. coagulans*; *B. firmus*; *B. lautus*; *B. lentus*; *B. megaterium*; *B. pumilus* o *B. stearothermophilus*.

20 El término «célula huésped» - en relación con la presente invención - incluye cualquier célula que comprende una secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa como se define en la presente o un vector de expresión como se define en la presente y que se utiliza en la producción recombinante de una lípido aciltransferasa que tiene las propiedades específicas como se definen en la presente.

Adecuadamente, la célula huésped puede ser una cepa deficiente en proteasa o menor en proteasa y/o una cepa deficiente en α-amilasa o menor en α-amilasa.

25 El término «heterólogo» como se utiliza en la presente significa una secuencia derivada de una fuente o especies genéticas independientes. Una secuencia heteróloga es una secuencia no huésped, una secuencia modificada, una secuencia de una cepa de célula huésped diferente, o una secuencia homóloga de una ubicación cromosómica diferente de la célula huésped.

Una secuencia «homóloga» es una secuencia que se encuentra en la misma fuente o especie genética, es decir, ocurre naturalmente en las especies relevantes de célula huésped.

30 El término «lípido aciltransferasa recombinante» como se utiliza en la presente significa que la lípido aciltransferasa se ha producido mediante recombinación genética. Por ejemplo, la secuencia nucleótida que codifica la lípido aciltransferasa se ha insertado en un vector de clonación, que resulta en una célula *B. licheniformis* caracterizada por la presencia de la lípido aciltransferasa heteróloga.

#### Secuencias reguladoras

35 En algunas aplicaciones, una secuencia lípido aciltransferasa para uso en los procedimientos y/o usos de la presente invención se pueden obtener enlazando operativamente una secuencia nucleótida que codifica la misma a una secuencia reguladora capaz de brindar la expresión de la secuencia nucleótida, como por ejemplo, mediante la célula huésped elegida (como una célula *B. licheniformis*).

A modo de ejemplo, se puede utilizar un vector que comprende la secuencia nucleótida de la presente invención enlazado operativamente a una secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

40 El término «enlazado operativamente» se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en la forma pretendida. Una secuencia reguladora «enlazada operativamente» a una secuencia codificante está ligada de forma tal que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control.

45 El término «secuencias reguladoras» incluye promotores y mejoradores y otras señales de regulación de la expresión.

El término «promotor» se utiliza en el sentido normal de la técnica, p.ej., un sitio de unión de ARN polimerasa.

50 La expresión mejorada de la secuencia nucleótida que codifica la enzima que tiene propiedades específicas como se define en la presente también se puede lograr mediante la selección de regiones reguladoras, p.ej., promotor, líder de secreción y regiones de terminadores que no son regiones reguladoras para la secuencia nucleótida que codifica la enzima por naturaleza.

Adecuadamente, la secuencia nucleótida de la presente invención se puede unir operativamente a al menos un promotor.

Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa puede enlazarse operativamente a una secuencia nucleótida que codifica una secuencia del terminador. Los ejemplos de secuencias de terminador adecuadas para uso en uno de los vectores, células huésped, procedimientos y/o usos de la presente invención incluyen: una secuencia de terminador de  $\alpha$ -amilasa (por ejemplo, 5 CGGGACTTACCGAAAGAAACCATCAATGATGGTTTCTTTTTGTTTCATAAA - SEQ ID No. 64), una secuencia de terminador de proteasa alcalina (por ejemplo, CAAGACTAAAGACCGTTCGCCGTTTTGCAATAAGCGGGCGAATCTTACATAAAA ATA - SEQ ID No. 65), una secuencia de terminador específica de ácido glutámico (por ejemplo, ACGGCCGTTAGATGTGACAGCCCGTCCAAAAGGAAGCGGGCTGTCTTCGTGTAT TATTGT - SEQ ID No. 66), 10 una secuencia de terminador de levanasa (por ejemplo, TCTTTTAAAGGAAAGGCTGGAATGCCCGCATTCCAGCCACATGATCATCGTTT - SEQ ID No. 67) y una secuencia de terminador de subtilisina E (por ejemplo, GCTGACAAATAAAAAGAAGCAGGTATGGAGGAACCTGCTTCTTTTACTATTATTG - SEQ ID No. 119). Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa puede enlazarse operativamente a un 15 terminador de  $\alpha$ -amilasa, como un terminador de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*.

#### Promotor

La secuencia promotora que se puede utilizar de conformidad con la presente invención puede ser heteróloga u homóloga a la secuencia que codifica una lípido aciltransferasa.

La secuencia promotora puede ser cualquier secuencia promotora capaz de dirigir la expresión de una lípido aciltransferasa en la célula huésped de elección. 20

Adecuadamente, la secuencia promotora puede ser homóloga a la especie *Bacillus*, por ejemplo, *B. licheniformis*. Preferentemente, la secuencia promotora es homóloga a la célula huésped de elección.

Adecuadamente, la secuencia promotora puede ser homóloga a la célula huésped. «Homóloga a la célula huésped» significa que se origina en el organismo huésped; es decir, una secuencia promotora que se encuentra naturalmente 25 en el organismo huésped.

Adecuadamente, la secuencia promotora se puede seleccionar del grupo que consiste de una secuencia nucleótida que codifica: un promotor de  $\alpha$ -amilasa, un promotor de proteasa, un promotor de subtilisina, un promotor de proteasa específica de ácido glutámico y un promotor de levansacarasa.

Adecuadamente, la secuencia promotora puede ser una secuencia nucleótida que codifica: LAT (p.ej., el promotor de alfa amilasa de *B. licheniformis*, también conocido como AmyL), AprL (p.ej., promotor Carlsberg de subtilisina), EndoGluC (p.ej., el promotor específico de ácido glutámico de *B. licheniformis*), AmyQ (p.ej., el promotor alfa amilasa de *B. amyloliquefaciens* promotor alfa amilasa) y SacB (p.ej., el promotor de levansacarasa *B. subtilis*). 30

Otros ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico en los procedimientos de la presente invención incluyen: el promotor del gen de la proteasa alcalina *Bacillus lentus* (aprH), ; 35 el promotor del gen alfa-amilasa *Bacillus subtilis* (amyE); el promotor del gen de amilasa maltógena *Bacillus stearothermophilus* (amyM); el promotor del gen de penicilinas *Bacillus licheniformis* (penP); los promotores de los genes xylA y xylB *Bacillus subtilis*; y/o el promotor del gen CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*.

En una realización preferida, la secuencia promotora es un promotor de  $\alpha$ -amilasa (como un promotor de  $\alpha$ -amilasa *Bacillus licheniformis*). Preferentemente, la secuencia promotora comprende la secuencia -35 a -10 del promotor de 40  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis*- ver Figuras 53 y 55.

La «secuencia -35 a -10» describe la posición en relación con el sitio de comienzo de la transcripción. Tanto «-35» como «-10» son casillas, es decir, un número de nucleótidos, cada uno comprende 6 nucleótidos y estas casillas están separadas por 17 nucleótidos. Estos 17 nucleótidos se suelen denominar «espaciadores». Esto se ilustra en la 45 Figura 55, donde las casillas -35 y -10 están subrayadas. Para evitar dudas, donde se utiliza la «secuencia -35 a -10» en la presente, se refiere a una secuencia desde el comienzo de la casilla -35 hasta el final de la casilla -10, es decir, que incluye la casilla -35, el espaciador largo de 17 nucleótidos y la casilla -10.

#### Péptidos señal

La lípido aciltransferasa producida por una célula huésped por expresión de la secuencia nucleótida que codifica la lípido aciltransferasa se puede secretar o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el 50 vector utilizado.

Se puede utilizar una secuencia señal para dirigir la secreción de las secuencias codificantes a través de una membrana celular particular. Las secuencias de señal pueden ser naturales o extrañas a la secuencia codificadora de la lípido aciltransferasa. Por ejemplo, la secuencia codificadora del péptido señal se puede obtener de un gen de amilasa o proteasa de una especie *Bacillus*, preferentemente de *Bacillus licheniformis*.

Las secuencias codificadoras del péptido señal adecuadas se pueden obtener de uno o más de los siguientes genes: gen de  $\alpha$ -amilasa maltógeno, gen de subtilisina, gen de beta-lactamasa, gen de proteasa neutral, gen prs A, y/o gen aciltransferasa.

5 Preferentemente, el péptido señal es un péptido señal de  $\alpha$ -amilasa *B. Licheniformis*, aciltransferasa de *Aeromonas* (por ejemplo, mkkwfvcllgialtvqa - SEQ ID No. 21), subtilisina *B. subtilis* (por ejemplo, mrskklwisllfalfiftmfa snmsaqa - SEQ ID No. 22) o subtilisina *B. licheniformis* (por ejemplo, mmrksfwfgmltafmlvftmefsd sasa - SEQ ID No. 23). Adecuadamente, el péptido señal puede ser el péptido señal de  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis*.

10 Sin embargo, se puede utilizar una secuencia codificadora del péptido señal capaz de dirigir la lípido aciltransferasa expresada en la vía de secreción de una célula huésped *Bacillus* (preferentemente una célula huésped *B. licheniformis*) de elección.

En algunas realizaciones de la presente invención, una secuencia nucleótida que codifica un péptido señal puede estar enlazado operativamente a una secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa de elección.

La lípido aciltransferasa de elección se puede expresar en una célula huésped como se define en la presente como una proteína de fusión.

15 Vector de expresión

El término «vector de expresión» significa un constructo capaz de una expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma del organismo, como un huésped *B. licheniformis*. El término «incorporado» cubre preferentemente la incorporación estable en el genoma.

20 La secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa como se define en la presente puede estar presente en un vector, en donde la secuencia nucleótida está enlazada operativamente a las secuencias reguladoras de forma tal que las secuencias reguladoras son capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleótida mediante un organismo huésped adecuado (como *B. licheniformis*), es decir, el vector es un vector de expresión.

25 Los vectores de la presente invención se pueden transformar en una célula huésped adecuada como se describió anteriormente para contemplar la expresión de un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa como se define en la presente.

La elección del vector, p.ej., plásmido, cósmido, virus o vector de fago, inserto genómico, dependerá en general en la célula huésped en la que se debe introducir. La presente invención puede cubrir otras formas de vectores de expresión que prestan funciones equivalentes y que son conocidos o se vuelven conocidos en la técnica.

30 Una vez transformado en la célula huésped de elección, el vector se puede replicar y funcionar en forma independiente del genoma de la célula huésped, o puede migrar en el genoma.

Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables - como un gen que confiere resistencia antibiótica p.ej., resistencia a ampicilina, canamicina, cloramfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección se puede lograr mediante co-transformación (como se describe en WO 91/17243).

35 Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o utilizar para transfectar o transformar una célula huésped.

El vector puede comprender, además, una secuencia nucleótida que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de la réplica de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

Lípido aciltransferasa

40 La secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa natural o una variante de lípido aciltransferasa.

La lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa natural o una variante de lípido aciltransferasa.

45 Por ejemplo, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede ser una como se describe en WO 2004/064537, WO 2004/064987, WO 2005/066347, WO 2006/008508, WO 2009/024862 o PCT/IB2009/054535.

50 El término «lípido aciltransferasa» como se utiliza en la presente significa, preferentemente, una enzima que tiene actividad aciltransferasa (generalmente clasificada como E.C. 2.3.1.x, por ejemplo 2.3.1.43), donde la enzima es capaz de transferir un grupo acilo de un lípido a uno o más sustratos aceptadores, como uno o más de los siguientes: un esteroles; un estanol; un carbohidrato; una proteína; una subunidad proteica; un polialcohol, como ácido ascórbico

y/o glicerol - preferentemente glicerol y/o un esterol, como colesterol.

5 Preferentemente, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que es capaz de transferir un grupo acilo de un fosfolípido (como se define en la presente) a un polialcohol, como ácido ascórbico y/o glicerol y/o un esterol, preferentemente glicerol o un esterol, más preferentemente un esterol (p.ej., colesterol).

10 Para algunos aspecto, el «aceptador de acilo» de conformidad con la presente invención puede ser un compuesto que comprende un grupo hidroxilo (-OH), como por ejemplo, alcoholes polivalentes, que incluyen glicerol; esteroles; estanoles; carbohidratos; hidroxí ácidos que incluyen ácidos de frutas, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, y ácido ascórbico; proteínas o subunidades de estas, como aminoácidos, hidrolisados proteicos y péptidos (proteína parcialmente hidrolizada) por ejemplo; y mezclas y derivados de estos. Preferentemente, el «aceptador de acilo» de conformidad con la presente invención es un polialcohol, como polioliol, más preferentemente, glicerol. A los efectos de esta invención el ácido ascórbico también se considera un polialcohol.

El aceptador de acilo es preferentemente un monoglicérido.

15 El aceptador de acilo no es preferentemente un diglicérido.

20 En un aspecto, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede, así como es capaz de transferir un grupo acilo de un lípido a un glicerol, adicionalmente transferir el grupo acilo de un lípido a uno o más de los siguientes: un carbohidrato, una proteína, una subunidad proteica, esterol y/o un estanol, preferentemente es capaz de transferir a un polialcohol, como ácido ascórbico y/o glicerol, más preferentemente un esterol como colesterol, y/o esteroles/estanoles vegetales.

En algunos aspectos, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que es capaz de esterificar al menos aproximadamente un 10%, más preferentemente al menos un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, o un 70% del aceptador de acilo.

25 En aspectos preferidos, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que es capaz de esterificar al menos aproximadamente un 10%, más preferentemente al menos un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, o un 70% del colesterol presente en la leche de inicio.

Preferentemente, el sustrato lipídico sobre el cual actúa la lípido transferasa es uno o más de los siguientes lípidos: un fosfolípido, como una lecitina, p.ej., fosfatidilcolina y/o fosfatidiletanolamina.

30 Este sustrato lipídico puede denominarse en la presente «donador acilo de lípidos». El término lecitina como se utiliza en la presente abarca fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa para uso en uno o más de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que es incapaz, o sustancialmente incapaz de actuar en un triglicérido y/o un 1-monoglicérido y/o 2-monoglicérido.

35 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa para uso en uno o más de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que no exhibe actividad lipasa de triacilglicerol (E.C. 3.1.1.3) o no exhibe actividad lipasa de triacilglicerol significativa (E.C. 3.1.1.3).

40 La actividad lipasa de triacilglicerol sobre la base de tributirina se mide de conformidad con Food Chemical Codex, 4th Edition, National Academy Press, 1996, p 803, con las modificaciones de que la muestra se disuelve en agua desionizada en lugar de un tampón de glicina, y el punto establecido de inicio del pH es 5,5 en lugar de 7. 1 Unidad de lipasa (LIPU) se define como la cantidad de enzima que puede liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico por minuto en estas condiciones de ensayo.

45 La lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que es sustancialmente incapaz de actuar en un triglicérido, puede tener una LIPU menor que 5 /kg de leche, más preferentemente una LIPU menor que 0,25 /kg de leche, y más preferentemente, una LIPU menor que 0,05 /kg de leche.

50 Adecuadamente, la lípido aciltransferasa para uso en cualquiera de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede exhibir una o más de las siguientes actividades fosfolipasa: actividad de fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) y/o actividad de fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32). La lípido aciltransferasa también puede tener una actividad de fosfolipasa B (E.C. 3.1.1.5).

Adecuadamente, para algunos aspectos, la lípido aciltransferasa puede ser capaz de transferir un grupo acilo de un fosfolípido a un polialcohol, preferentemente glicerol y/o ácido ascórbico.

Adecuadamente, para algunos aspectos, la lípido aciltransferasa puede ser capaz de transferir un grupo acilo de un

fosfolípido a un estanol y/o esteroles, preferentemente colesterol.

Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención, codifica una lípido aciltransferasa que es capaz de transferir un grupo acilo de un fosfolípido a un esteroles y/o un estanol para formar al menos un éster de esteroles y/o un éster de estanol.

- 5 La lípido aciltransferasa puede ser capaz de transferir un grupo acilo de un lípido a un poliol como glicerol y/o un esteroles como colesterol o esteroles/estanoles vegetales. Por lo tanto, en una realización, el «aceptador de acilo» de conformidad con la presente invención puede ser glicerol y/o colesterol o esteroles/estanoles vegetales.

En algunos aspectos, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede comprender un motivo GDSx y/o un motivo GANDY.

- 10 Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa se caracteriza como una enzima que posee actividad aciltransferasa y que comprende el motivo de secuencia de aminoácido GDSX, donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

- 15 Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa o lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención se puede obtener, preferentemente se obtiene, de un organismo de uno o más de los siguientes géneros: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*. Preferentemente, la lípido aciltransferasa se puede obtener, preferentemente, se obtiene, de un organismo del género *Aeromonas*.

- 20 En algunos aspectos de la presente invención, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención codifica una lípido aciltransferasa que comprende un residuo de ácido aspártico en una posición que corresponde a N-80 en la secuencia aminoácida de la lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila* que se muestra en la SEQ ID No. 34.

- 25 En algunos aspectos de la presente invención, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que comprende un residuo de ácido aspártico en una posición que corresponde a N-80 en la secuencia aminoácida de la lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila* que se muestra como la SEQ ID No. 34.

- 30 Adicionalmente o como alternativa, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia aminoácida que se muestra como SEQ ID No. 16, o una secuencia aminoácida que tiene una homología de 75% o más a dicha secuencia. Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia aminoácida que se muestra como SEQ ID No. 16.

- 35 Adicionalmente o como alternativa, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia aminoácida que se muestra como SEQ ID No. 68, o una secuencia aminoácida que tiene una homología de 75% o más a dicha secuencia. Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia aminoácida que se muestra como SEQ ID No. 68.

- 40 En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención tiene una secuencia aminoácida que se muestra en SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68, o tiene una secuencia aminoácida que tiene una identidad de al menos un 75% con la secuencia, preferentemente una identidad de al menos un 80%, preferentemente al menos un 85%, preferentemente al menos un 95%, preferentemente al menos un 98% con la secuencia.

- 45 Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa se puede caracterizar utilizando los siguientes criterios:

La enzima posee actividad aciltransferasa que se puede definir como actividad de transferencia de éster a través de la cual la parte acilo de un enlace éster original de un donador acilo de lípidos se transfiere a un aceptador de acilo, preferentemente glicerol o colesterol, para formar un nuevo éster; y

- 50 La enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácido GDSX, donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

Preferentemente, X del motivo GDSX es L o Y. Más preferentemente, X del motivo GDSX es L. Por lo tanto, preferentemente la enzima de conformidad con la presente invención comprende el motivo de secuencia aminoácida GDSL.

El motivo GDSX está compuesto de cuatro aminoácidos conservados. Preferentemente, la serina en el motivo es una

serina catalítica de la enzima lípido aciltransferasa. Adecuadamente, la serina del motivo GDSX puede estar en una posición que corresponde a Ser-16 en la enzima lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila* que se describe en Brumlik & Buckley (Journal of Bacteriology Apr. 1996, Vol. 178, No. 7, p 2060-2064).

5 Para determinar si una proteína tiene el motivo GDSX de conformidad con la presente invención, la secuencia se compara preferentemente con los perfiles modelo oculto de Markov (perfiles HMM) de la base de datos Pfam de conformidad con los procedimientos descritos en WO 2004/064537 o WO 2004/064987 .

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa se puede alinear utilizando la secuencia de consenso Pfam00657 (para una explicación completa, ver WO 2004/064537 o WO 2004/064987).

10 Preferentemente, una coincidencia positiva con el perfil del modelo oculto de Markov (perfil HMM) de la familia de dominio pfam 00657 indica la presencia de dominio GDSL o GDSX de conformidad con la invención.

15 Preferentemente, cuando se alinea con la secuencia de consenso Pfam00657, la lípido aciltransferasa para uso en los procedimientos o usos de la invención puede tener al menos, preferentemente, más de uno, preferentemente más de dos, de los siguientes, un bloque GDSx, un bloque GANDY, un bloque HPT. Adecuadamente, la lípido aciltransferasa puede tener un bloque GDSx y un bloque GANDY. Alternativamente, la enzima puede tener un bloque GDSx y un bloque HPT. Preferentemente, la enzima comprende al menos un bloque GDSx. Ver WO 2004/064537 o WO 2004/064987 para más información.

Preferentemente, los residuos del motivo GANDY se seleccionan de GANDY, GGND, GGNDL, más preferentemente GANDY.

20 Preferentemente, cuando se alinea con la secuencia de consenso Pfam00657, la enzima para uso en los procedimientos o usos de la invención tiene al menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente más de dos, preferentemente más de tres, preferentemente más de cuatro, preferentemente más de cinco, preferentemente más de seis, preferentemente más de siete, preferentemente más de ocho, preferentemente más de nueve, preferentemente más de diez, preferentemente más de once, preferentemente más de doce, preferentemente más de trece, preferentemente más de catorce, de los siguientes residuos de aminoácidos en comparación con la secuencia de polipéptido *A. hydrophila*, a saber SEQ ID No. 1: 28His, 29His, 30His, 31His, 32Gly, 33Asp, 34Ser, 35His, 130His, 131Gly, 132His, 133Asn, 134Asp, 135His, 309His.

25 El dominio pfam00657 GDSX es un identificador único que distingue proteínas que poseen este dominio de otras enzimas.

30 La secuencia de consenso pfam00657 está presentada en la Figura 3 como SEQ ID No. 2 Esto se deriva de la identificación de la familia pfam 00657, la versión 6 de la base de datos, la cual también se puede denominar pfam00657.6

La secuencia de consenso se puede actualizar utilizando otras publicaciones de la base de datos pfam (por ejemplo, ver WO 2004/064537 o WO 2004/064987).

35 En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que se puede caracterizar utilizando el siguiente criterio:

(i) la enzima posee actividad aciltransferasa que se puede definir como actividad de transferencia de éster a través de la cual la parte acilo de un enlace éster original de un donador acilo de lípidos se transfiere a un aceptador de acilo, preferentemente glicerol o colesterol, para formar un nuevo éster, preferentemente monoglicérido o éster de colesterol, respectivamente;

40 (ii) la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácido GDSX, donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.;

(iii) la enzima comprende His-309 o comprende un residuo de histidina en una posición que corresponde a His-309 en la enzima lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila* que aparece en las Figuras 2 y 4 (SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 3).

45 Preferentemente, el residuo aminoácido del motivo GDSX es L.

En la SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1, los primeros 18 residuos aminoácidos forman una secuencia de señal. His-309 de la secuencia de longitud completa, que es la proteína que incluye la secuencia de señal, se iguala a His-291 de la parte madura de la proteína, es decir, la secuencia sin la secuencia de señal.

50 En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención es un lípido aciltransferasa que comprende la siguiente tríada catalítica: Ser-34, Asp-306 y His-309 o comprende un residuo de serina, un residuo de ácido aspártico y un residuo de histidina, respectivamente, en posiciones que corresponden a Ser-34, Asp-306 y His-309 en la enzima lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila* que aparece en la Figura 4 (SEQ ID No. 3) o Figura 2 (SEQ ID No. 1). Como se indicó anteriormente, la secuencia

- que aparece en la SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1, los primeros 18 residuos aminoácidos forman una secuencia de señal. Ser-34, Asp-306 y His-309 de la secuencia de longitud completa, que es la proteína que incluye la secuencia de señal, se igualan a Ser-16, Asp-288 y His-291 de la parte madura de la proteína, es decir, la secuencia sin la secuencia de señal. En la secuencia de consenso pfam00657, como aparece en la Figura 3 (SEQ ID No. 2), los
- 5 residuos de sitio activo corresponden a Ser-7, Asp-345 y His-348.
- En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que se puede caracterizar utilizando el siguiente criterio:
- la enzima posee actividad aciltransferasa que se puede definir como actividad de transferencia de éster a través de la cual la parte acilo de un enlace éster original de un primer donador acilo de lípidos se transfiere a un aceptador de
- 10 acilo para formar un nuevo éster; y
- la enzima comprende al menos Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 y His-309 o comprende residuos de glicina, ácido aspártico, serina, ácido aspártico e histidina en posiciones que corresponden a Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-306 y His-309, respectivamente, en la enzima lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila* que se muestra en SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1.
- 15 Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención se puede codificar mediante una de las siguientes secuencias nucleótidas:
- (a) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 36 (ver Figura 29);
- (b) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 38 (ver Figura 31);
- (c) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 39 (ver Figura 32);
- 20 (d) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 42 (ver Figura 35);
- (e) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 44 (ver Figura 37);
- (f) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 46 (ver Figura 39);
- (g) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 48 (ver Figura 41);
- (h) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 49 (ver Figura 57);
- 25 (i) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 50 (ver Figura 58);
- (j) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 51 (ver Figura 59);
- (k) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 52 (ver Figura 60);
- (l) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 53 (ver Figura 61);
- (m) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 54 (ver Figura 62);
- 30 (n) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 55 (ver Figura 63);
- (o) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 56 (ver Figura 64);
- (p) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 57 (ver Figura 65);
- (q) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 58 (ver Figura 66);
- (r) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 59 (ver Figura 67);
- 35 (s) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 60 (ver Figura 68);
- (t) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 61 (ver Figura 69);
- (u) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 62 (ver Figura 70);
- (v) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 63 (ver Figura 71);
- (w) o
- 40 una secuencia nucleótida que tiene un 70% o más, preferentemente un 75% o más, de identidad con una de las secuencias que se muestran como SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No.

61, SEQ ID No. 62 o SEQ ID No. 63.

5 La secuencia nucleótida puede tener una identidad de un 80% o más, preferentemente, un 85% o más, más preferentemente, un 90% o más, y aún más preferentemente un 95% o más con una de las secuencias que se muestran como SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 62 o SEQ ID No. 63.

10 En una realización, la secuencia nucleótida que codifica una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención es una secuencia nucleótida que tiene una identidad de un 70% o más, preferentemente de un 75% o más, con una de las secuencias que se muestran como: SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62, y SEQ ID No. 63. Adecuadamente, la secuencia nucleótida puede tener una identidad del 80% o más, preferentemente del 85% o más, preferentemente del 90% o más y aún más preferentemente del 95% o más con una de las secuencias que se muestran como: SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62, y SEQ ID No. 63.

15 En una realización, la secuencia nucleótida que codifica una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención es una secuencia nucleótida que tiene una identidad de un 70% o más, de un 75% o más, de un 80% o más, preferentemente de un 85% o más, más preferentemente de un 90% o más y aún más preferentemente de un 95% o más con la secuencia que se muestran como SEQ ID No. 49.

20 Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- (i) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 3
- (ii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 4
- (iii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 5
- 25 (iv) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 6
- (v) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 7
- (vi) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 8
- (vii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 9
- (viii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 10
- 30 (ix) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 11
- (x) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 12
- (xi) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 13
- (xii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 14
- (xiii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 1
- 35 (xiv) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 15
- (xv) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 16
- (xvi) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 17
- (xvii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 18
- (xviii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 34
- 40 (xix) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 35
- (xx) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 68
- (xxi) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 121
- (xxii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 122
- (xxiii) la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 123 o

una secuencia de aminoácido que tiene un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 98% o más de identidad con una de las secuencias que se muestran como SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14 o SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122 o SEQ ID No. 123.

Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 3 o como SEQ ID No. 4 o SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 15 o SEQ ID No. 16, o SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122 o SEQ ID No. 123 o comprende una secuencia de aminoácido que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 80% o más, preferentemente del 85% o más, preferentemente del 90% o más, preferentemente del 95% o más con la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 3 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 4 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 15 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 16 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 34 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 35 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 68 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 121 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 122 o la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 123.

Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de un 80% o más, preferentemente, un 85% o más, más preferentemente, un 90% o más, o aún más preferentemente un 95% o más con una de las secuencias que se muestran como SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122 o SEQ ID No. 123.

Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 1-100 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(b) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 101-200 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(c) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 201-300 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1; o

(d) una secuencia de aminoácido que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 85% o más, preferentemente del 90% o más, aún más preferentemente del 95% o más con una de las secuencias de aminoácido que se definen en los puntos (a) a (c) anteriores.

Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 28-39 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(b) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 77-88 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(c) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 126-136 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(d) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 163-175 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(e) una secuencia de aminoácido que se muestra como residuos de aminoácido 304-311 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1; o

(f) una secuencia de aminoácido que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 85% o más, preferentemente del 90% o más, aún más preferentemente del 95% o más con una de las secuencias de aminoácido que se definen en los puntos (a) a (e) anteriores.

En un aspecto, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser la lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis* como se

describe en EP 1 275 711. Por lo tanto, en un aspecto, la lípido aciltransferasa para uso en el procedimiento y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una de las secuencias de aminoácido que se indican en SEQ ID No. 17 o SEQ ID No. 18.

5 Por preferencia, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 16, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente de un 85% o más, más preferentemente, de un 90% o más, aún más preferentemente de un 95% o más, aún más preferentemente de un 98% o más, o aún más preferentemente de un 99% o más con la SEQ ID No. 16. Esta enzima podría considerarse una variante de enzima.

10 En un aspecto, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser lecitina:lípido aciltransferasa de colesterol (LCAT) o variante de este (por ejemplo, una variante hecha mediante evolución molecular).

15 LCAT adecuados son conocidos en la técnica y se pueden obtener de uno o más de los siguientes organismos, por ejemplo: mamíferos, ratas, ratones, pollos, *Drosophila melanogaster*, plantas que incluyen *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, nematodos, hongos y levadura.

20 En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser la lípido aciltransferasa que se puede obtener, preferentemente, que se obtuvo, de las cepas de *E. coli* TOP 10 que acogen pPet12aAhydro y pPet12aASalmo depositados por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhague K, Dinamarca de conformidad con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes en la Colección Nacional de Bacterias Industriales, Marinas y Alimenticias (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escocia, Reino Unido el 22 de diciembre de 2003, con los números de ingreso NCIMB 41204 y NCIMB 41205, respectivamente.

25 Una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una fosfolípido acil transferasa de glicerol. Las fosfolípido acil transferasas de glicerol incluyen aquellas aisladas de *Aeromonas spp.*, preferentemente *Aeromonas hydrophila* o *A. salmonicida*, más preferentemente *A. salmonicida* o variantes de estos.

30 Las lípido aciltransferasas más preferidas para uso en la presente invención se codifican mediante SEQ ID No. 1, 3, 4, 15, 16, 34 y 35. El entendido en la técnica reconocerá que es preferible que los péptidos señal de la acil transferasa se hayan partido durante la expresión de la transferasa. El péptido señal de SEQ ID No. 1, 3, 4 y 15 son aminoácidos 1 a 18. Por lo tanto, las regiones más preferidas son aminoácidos 19 a 335 para SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 3 (*A. hydrophilia*) y aminoácidos 19 a 336 para SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 15 (*A. salmonicida*). Cuando se utiliza para determinar la homología de identidad de las secuencias de aminoácido, se prefiere que las alineaciones como se describen en la presente utilicen la secuencia madura.

35 En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en la presente invención comprende (o consiste de) la secuencia de aminoácido que aparece en la SEQ ID No. 16 o comprende (o consiste de) una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% , al menos un 98% con SEQ ID. No 16.

40 En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en la presente invención es codificada por una secuencia nucleótida que comprende (o consiste de) una secuencia nucleótida que se muestra en SEQ ID No. 49 o comprende (o consiste de) una secuencia nucleótida que tiene una identidad de al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% , al menos un 98% con SEQ ID. No 49.

45 Por lo tanto, las regiones más preferidas para determinar la homología (identidad) son aminoácidos 19 a 335 para SEQ ID No. 1 y No. 3 (*A. hydrophilia*) y aminoácidos 19 a 336 para SEQ ID No. 4, y SEQ ID No. 15 (*A. salmonicida*). Las SEQ ID No. 34 y 35 son secuencias proteicas maduras de una lípido acil transferasa de *A. hydrophilia* y *A. salmonicida* respectivamente que pueden sufrir una modificación post-translacional o no.

Una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que también se puede aislar de *Thermobifida*, preferentemente, *T. fusca*, más preferentemente aquella codificada por SEQ ID No. 28.

50 Las lípido aciltransferasa adecuadas para uso de conformidad con la presente invención y/o en los procedimientos de la presente invención pueden comprender una de las siguientes secuencias aminoácidos y/o se pueden codificar mediante las siguientes secuencias nucleótidas:

55 a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que exhibe una actividad lípido aciltransferasa y es al menos un 70% idéntica (preferentemente, al menos un 80%, más preferentemente un 90% idéntica) a la secuencia de polipéptido que aparece en la SEQ ID No. 16, o al polipéptido que aparece en la SEQ ID No. 68, o al polipéptido que aparece en la SEQ ID No. 121, o al polipéptido que aparece en la SEQ ID No. 122 o al polipéptido que aparece en la SEQ ID No.

123;

- 5 b) un polipéptido (aislado) que comprende (o consiste de) una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID No. 16 o la SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácido que es al menos un 70% idéntica (preferentemente, al menos un 80% idéntica, más preferentemente al menos un 90% idéntica) a la SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122 o SEQ ID No. 123;
- c) un ácido nucleico que codifica una lípido aciltransferasa, cuyo ácido nucleico comprende (o consiste de) una secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 49 o una secuencia nucleótida que es al menos un 70% idéntica (preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% idéntica) a la secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 49;
- 10 d) un ácido nucleico que hibrida en condiciones de rigurosidad media o alta a una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 49 y codifica un polipéptido que exhibe una actividad lípido aciltransferasa;
- e) un ácido nucleico que es un fragmento de las secuencias de ácido nucleico especificadas en a), c) o d); o
- f) un polipéptido que es un fragmento del polipéptido especificado en b).
- 15 Una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que también se puede aislar de *Streptomyces*, preferentemente *S. avermitis*, más preferentemente aquella codificada por SEQ ID No. 32. Otras enzimas posibles para uso en la presente invención de *Streptomyces* incluyen aquellas codificadas por SEQ ID Nos. 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 31, y 33.
- 20 Una enzima para uso en la invención también se puede aislar de *Corynebacterium*, preferentemente *C. efficiens*, más preferentemente aquella codificada por SEQ ID No. 29.
- Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una de las secuencias de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 37, 38, 40, 41, 43, 45, o 47, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, o un 98% con ellas, o que puede ser codificada por una de las secuencias nucleótidas que aparecen como SEQ ID No. 36, 39, 42, 44, 46, o 48 o una secuencia nucleótida que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97% o un 98% con ellas.
- 25 En una realización, la secuencia nucleótida que codifica una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste de:
- 30 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que aparece en la SEQ ID No. 36;
- b) un ácido nucleico que se relaciona con la secuencia nucleótida de SEQ ID No. 36, por degeneración del código genético; y
- c) un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que tiene una identidad de al menos un 70% con la secuencia nucleótida que se muestra en SEQ ID No. 36.
- 35 En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID No. 37 o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 60%.
- En otra realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una de las secuencias de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 37, 38, 40, 41, 43, 45, o 47, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, o un 98% con ellas, o que puede ser codificada por una de las secuencias nucleótidas que aparecen como SEQ ID No. 39, 42, 44, 46, o 48 o una secuencia nucleótida que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97% o un 98% con ellas.
- 40
- 45 En otra realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una de las secuencias de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 38, 40, 41, 45, o 47, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, o un 98% con ellas, para los usos descritos en la presente.
- 50 En otra realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una de las secuencias de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 38, 40, 41, o 47, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, o un 98% con ellas, para los usos descritos en la presente.

Más preferentemente, en una realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 47, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, o un 98% con ellas.

- 5 En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 43, o 44, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, o un 98% con ellas.

- 10 En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 41, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, o un 98% con ellas.

En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser codificada por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste de:

- 15 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que aparece en la SEQ ID No. 36;
- b) un ácido nucleico que se relaciona con la secuencia nucleótida de SEQ ID No. 36, por degeneración del código genético; y
- c) un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que tiene una identidad de al menos un 70% con la secuencia nucleótida que se muestra en SEQ ID No. 36.

- 20 En una realización, la enzima lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que se puede obtener, preferentemente se obtuvo, de las cepas de *Streptomyces* L130 o L131 depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen K, Dinamarca de conformidad con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes en la Colección Nacional de Bacterias Industriales, Marinas y Alimenticias (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escocia, Reino Unido el 23 de junio de 2004, con los números de ingreso NCIMB 41226 y NCIMB 41227, respectivamente.

- 25 Las secuencias nucleótidas adecuadas que codifican una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención pueden codificar un polinucleótido que codifica una lípido aciltransferasa (SEQ ID No. 16); o pueden codificar una secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa (SEQ ID No. 16).

Una lípido aciltransferasa adecuada para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácido que se puede identificar mediante alineación con la secuencia L131 (SEQ ID No. 37) utilizando Align X, el algoritmo de alineamiento por pares Clustal W de VectorNTI utilizando configuraciones predeterminadas.

- 35 Una alineación de la secuencia L131 y homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* ilustra que la conservación del motivo GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), la casilla GANDY, que es GGNDx o GGNDL, y el bloque HPT (considerado la histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados se destacan en la Figura 42.

- 40 Cuando se alinea a la secuencia de consenso pfam Pfam00657 (como se describe en WO 2004/064987) y/o la secuencia L131 divulgada en la presente (SEQ ID No. 37) es posible identificar tres regiones conservadas, el bloque GDSx, el bloque GANDY y el bloque HTP (ver WO 2004/064987 para más información).

Cuando se alinea a la secuencia de consenso pfam Pfam00657 (como se describe en WO 2004/064987) y/o la secuencia L131 divulgada en la presente (SEQ ID No. 37)

- 45 i) La lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene un motivo GDSx, más preferentemente un motivo GDSx seleccionado del motivo GDSL o GDSY.

y/o

ii) La lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene un bloque GANDY, más preferentemente un bloque GANDY que comprende amino GGNDx, más preferentemente GGNDx o GGNDL. y/o

- 50 iii) La lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene, preferentemente un bloque HTP. Y preferentemente

iv) La lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una

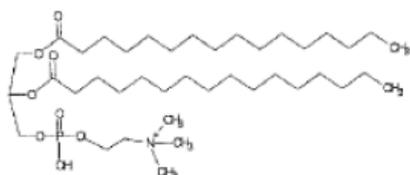
lípido aciltransferasa que tiene, preferentemente, un motivo GDSx o GDSY, y un bloque GANDY que comprende amino GGNDx, preferentemente GGND A o GGNDL, y un bloque HTP (histidina conservada).

5 La lípido aciltransferasa como se utiliza en la presente se puede denominar colesterol aciltransferasa de glicerofosfolípidos. Es decir, la lípido aciltransferasa para uso en la presente invención tiene, preferentemente, la capacidad de «hidrolizar» fosfolípidos y a la vez esterificar el colesterol con el ácido graso libre de la hidrolización; esta es una reacción transferasa efectiva (es decir, una interesterificación y/o una reacción de transesterificación).

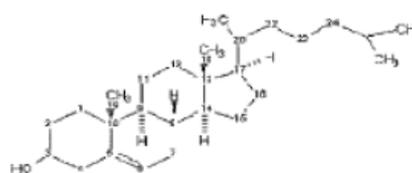
10 El grado de «hidrólisis» se puede describir como la relación de fosfatidilcolina (PC) y/o fosfatidiletanolamina (PE) convertida en liso-PC o liso-PE, respectivamente. Con la hidrolización enzimática de PC en liso-PC, se altera la relación entre la parte hidrofílica de la molécula fosfolípida (grupo polar) y la parte hidrófoba (cadenas de ácido graso). Al remover un ácido graso (ácidos grasos saturados y/o insaturados), la parte hidrófoba se reduce, haciendo que toda la molécula sea hidrofílica. Además, la conformación de la molécula estérica puede cambiar, lo que puede incluir en las estructuras de fase (p.ej., micelación) formadas por las moléculas en dispersión, así como interacciones con otras moléculas como por ejemplo, proteínas lácteas.

15 Los productos de liso-lectina son conocidos por poseer mejores propiedades emulsionantes. Con un alto grado de interesterificación y/o transesterificación, es posible obtener tamaños de gota de aceite más pequeñas en medio en una prueba de emulsificación.

**Fosfatidicolina**

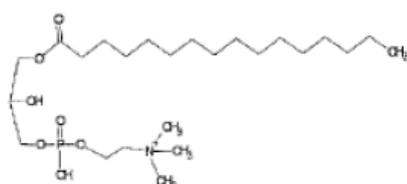


**Colesterol**

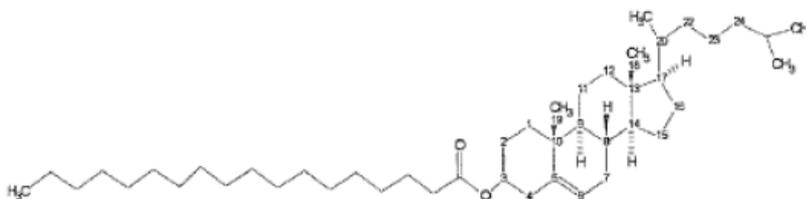


+ lípido aciltransferasa    ↓    enzima

**Lisofosfatidicolina**



**Éster de colesterol**



20 La función de la lípido aciltransferasa es que el colesterol y los fosfolípidos cambiarán en colesterol-ésteres y liso-fosfolípidos, generando dos componentes resultantes con propiedades activas en superficie en relación con las emulsiones O/W. Por lo tanto, los productos finales contendrán una cantidad de colesterol significativamente reducida o no tendrán colesterol y una mejor estabilidad de emulsión.

La enzima de conformidad con la presente invención no es preferentemente una enzima fosfolipasa, como una

fosfolipasa A1 clasificada como E.C. 3.1.1.32 o una fosfolipasa A2 clasificada como E.C. 3.1.1.4.

#### Variante de lípido aciltransferasa

En una realización preferida, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa que es una variante de lípido aciltransferasa.

Se pueden utilizar las variantes que tienen mayor actividad en los fosfolípidos, como mayor actividad hidrolítica y/o mayor actividad transferasa, preferentemente, mayor actividad transferasa en fosfolípidos.

Preferentemente, la variante de lípido aciltransferasa se prepara con una o más modificaciones de aminoácido de las lípido aciltransferasas como se definió anteriormente.

Adecuadamente, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que puede ser una variante de lípido aciltransferasa, en donde la enzima se puede caracterizar por comprender el motivo GDSX de la secuencia de aminoácido, donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácido L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y donde la variante de enzima comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con una secuencia progenitora en uno o más de los residuos de aminoácido definidos en el conjunto 2 o conjunto 4 o conjunto 6 o conjunto 7 (como se define en WO 2005/066347 y de aquí en adelante).

Por ejemplo, la variante de lípido aciltransferasa se puede caracterizar porque la enzima comprende el motivo GDSX de la secuencia de aminoácido, donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácido L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S y donde la variante de la enzima comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con la secuencia progenitora en uno o más de los residuos de aminoácido detallados en el conjunto 2 o 4 o 6 o 7 (como se definen en WO 2005/066347 y de aquí en adelante) identificados por dicha secuencia progenitora por estar estructuralmente alineados con el modelo estructural P10480 definido en la presente, que se obtiene, preferentemente, mediante alineación estructural de P10480; la estructura de cristal coordina con 1IVN.PDB y/o 1DEO.PDB como se define en WO 2005/066347 y aquí en adelante.

En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede ser una variante de lípido aciltransferasa que se caracteriza porque la enzima comprende el motivo GDSX de la secuencia de aminoácido, donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácido L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y donde la variante de enzima comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con una secuencia progenitora en uno o más de los residuos de aminoácido definidos en el conjunto 2 cuando dicha secuencia progenitora se alinea a la secuencia de consenso pfam (SEQ ID No. 2 - Figura 3) y se modifica de conformidad con el modelo estructural de P10480 para garantizar una superposición de mejor adecuación como se define en WO 2005/066347 y de aquí en adelante.

Adecuadamente, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede ser una variante de la enzima lípido aciltransferasa que puede comprender una secuencia de aminoácido, la cual se muestra como SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, , SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35, excepto por una o más modificaciones de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido definidos en el conjunto 2 o 4 o 6 o 7 (como se define en WO 2005/066347 y de aquí en adelante) identificados por alineación de secuencia con SEQ ID No. 34.

Alternativamente, la lípido aciltransferasa puede ser una variante de la enzima lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácido, la cual se muestra como SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35, excepto por una o más modificaciones de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido definidos en el conjunto 2 o 4 o 6 o 7 como se define en WO 2005/066347 y de aquí en adelante, identificados por la alineación estructural de dicha secuencia progenitora con el modelo estructural de P10480 como se define en la presente, el cual se obtiene preferentemente por alineación estructural de P10480 definida en la presente; la estructura de cristal coordina con 1IVN.PDB y/o 1DEO.PDB como se describe en WO 2005/066347 y de aquí en adelante.

Alternativamente, la lípido aciltransferasa puede ser una variante de la enzima lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácido, la cual se muestra como SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35, excepto por una o más modificaciones de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido definidos en el conjunto 2 identificado cuando dicha secuencia progenitora se alinea con la secuencia de consenso (SEQ ID No. 2) y modificado de conformidad con un modelo estructural de P10480 para garantizar la superposición de mejor adecuación como se describe en WO

2005/066347 y de aquí en adelante.

Preferentemente, la enzima progenitora es una enzima que comprende, o es homóloga a, la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 34 y/o SEQ ID No. 15 y/o SEQ ID No. 35.

5 Preferentemente, la lípido aciltransferasa puede ser una variante de enzima que comprende una secuencia de aminoácido, donde dicho aminoácido se muestra como SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35, excepto por una o más modificaciones de aminoácido en uno o más residuos de aminoácido definidos en conjunto 2 o 4 o 6 o 7 como se define en WO 2005/066347 y de aquí en adelante.

Otras variantes de lípido aciltransferasa adecuadas para uso en los procedimientos/ usos de la presente invención son aquellas descritas en PCT/IB2009/05435.

10 La estructura terciaria de las lípidos aciltransferasas ha revelado una estructura inusual e interesante que permite que las lípido aciltransferasa se construyan con más éxito. En particular, la estructura terciaria de la lípido aciltransferasa ha revelado una estructura de cueva y quebrada; los residuos que forman estas estructuras se definen a continuación.

15 Las alteraciones en la región de cueva pueden (por ejemplo) alterar la especificidad de longitud de la cadena de sustrato de la enzima por ejemplo.

Se ha descubierto que las alteraciones en la cueva (particularmente algunas modificaciones clave preferidas) son importantes en, por ejemplo, mejorar o cambiar la especificidad del sustrato de la enzima.

20 En particular, los inventores han descubierto que existe un número de modificaciones en la quebrada que tienen una calificación alta y producen variantes interesantes con propiedades mejoradas - estas se pueden encontrar en las posiciones 31, 27, 85, 86, 119 y 120. En algunas realizaciones, se prefieren las posiciones 31 y/o 27.

25 Estas variantes de lípido aciltransferasas se pueden codificar mediante una secuencia nucleótida que tiene una identidad de al menos un 90% con una secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa progenitora y comprenden al menos una modificación (adecuadamente, al menos dos modificaciones) en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, un aminoácido ubicado en a) la región de quebrada de la enzima y/o b) sitio de inserción 1 y/o c) sitio de inserción 2, donde la región de quebrada, el sitio de inserción 1 y/o el sitio de inserción 2 de la enzima se define como aquella región que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la región de quebrada, sitio de inserción 1, o sitio de inserción 2 de la enzima que se muestra como SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68 en la presente, como se describe a continuación.

30 En una realización, las modificaciones en una posición ubicada en la quebrada y/o en el sitio de inserción 1 y/o el sitio de inserción 2 se combinan con al menos una modificación en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, a un aminoácido ubicado fuera de la región de quebrada y/o sitio de inserción 1 y/o sitio de inserción 2.

35 En una realización, la lípido aciltransferasa comprende al menos una modificación (adecuadamente, al menos dos modificaciones) en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, a un aminoácido ubicado en la posición 27, 31, 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 232, 235 y/o 236 (preferentemente, en la posición 27, 31, 85, 86, 119 y/o 120, más preferentemente, en la posición 27 y/o 31), donde la numeración de la posición se define como aquella posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que aparece en la presente como SEQ ID No. 16.

40 En otra realización, la variante de lípido aciltransferasa comprende al menos una modificación en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, a un aminoácido ubicado en la posición 27 y/o 31 en combinación con al menos otra modificación, donde la numeración de la posición se define como aquella posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que aparece en la presente como SEQ ID No. 16.

45 Adecuadamente, al menos otra modificación puede estar en una o más de las siguientes posiciones 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 23, 81, 82, 289, 227, 229, 233, 33, 207, 130, donde la numeración de la posición se define como aquella posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16.

50 La secuencia de aminoácido de la lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede comprender una cadena principal modificada tal que se produce al menos una modificación (adecuadamente, al menos dos modificaciones) en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, un aminoácido ubicado en a) la región de quebrada de la enzima y/o b) sitio de inserción 1 y/o c) sitio de inserción 2, donde la región de quebrada, el sitio de inserción 1 y/o el sitio de inserción 2 se define como aquella región que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la región de quebrada, sitio de inserción 1, o sitio de inserción 2 de la enzima que se muestra como SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68.

En una realización, las modificaciones en una posición ubicada en la quebrada y/o en el sitio de inserción 1 y/o el sitio de inserción 2 se combinan con al menos una modificación en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, a un aminoácido ubicado fuera de la región de quebrada y/o sitio de inserción 1 y/o sitio de inserción 2.

5 Preferentemente, la cadena principal de la secuencia de aminoácido de la lípido aciltransferasa se modifica de forma tal que se produce al menos una modificación (adecuadamente, al menos dos modificaciones) en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, a un aminoácido ubicado en la posición 27, 31, 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 232, 235 y/o 236 (preferentemente, en la posición 27, 31, 85, 86, 119 y/o 120, más  
10 preferentemente, en la posición 27 y/o 31), donde la numeración de la posición se define como aquella posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que aparece en la presente como SEQ ID No. 16.

En otras realizaciones preferidas, la cadena principal de secuencia del aminoácido de la de lípido aciltransferasa comprende al menos una modificación (adecuadamente, al menos dos modificaciones) en una posición que corresponde, en la secuencia de aminoácido codificada, a un aminoácido ubicado en la posición 27, 31 en  
15 combinación con al menos otra modificación, donde la numeración de la posición se define como aquella posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que aparece en la presente como SEQ ID No. 16.

Adecuadamente, al menos otra modificación puede estar en una o más de las siguientes posiciones 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 23, 81, 82, 289, 227, 229, 233, 33, 207, 130, donde la numeración de la posición se define como  
20 aquella posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16.

También se proporciona una variante de lípido aciltransferasa o una lípido aciltransferasa alterada para uso en la presente invención que comprende una secuencia de aminoácido que es al menos un 70% idéntica a la lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 o 68, donde un  
25 segmento que determina una especificidad de longitud de cadena de sustrato que está inmediatamente en la N-terminal del residuo Asp de la tríada catalítica de dicha lípido aciltransferasa alterada, tiene una longitud alterada en relación con dicha lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 o 68.

Preferentemente, la alteración comprende una inserción o eliminación de aminoácido en dicho segmento que determina la especificidad de longitud de cadena de sustrato, como por ejemplo sustituir un segmento que determina la especificidad de longitud de cadena de sustrato de la enzima progenitora con el segmento que determina la especificidad de longitud de cadena de sustrato de una lípido aciltransferasa diferente para producir la lípido aciltransferasa alterada. Preferentemente, dicha alteración aumenta la longitud de la cadena acilo que puede transferirse mediante dicha lípido aciltransferasa.

35 Preferentemente, la lípido aciltransferasa alterada comprende una secuencia de aminoácido que es al menos un 90% idéntica a la lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* que aparece en la presente como SEQ ID No. 16 o 68.

La secuencia nucleótida que codifica la variante de la enzima lípido aciltransferasa antes de la modificación es una secuencia nucleótida que se muestra en la presente como SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 63 o SEQ ID No. 24; o es una secuencia nucleótida que tiene una identidad de al menos un 70% (preferentemente, una identidad de al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90%, aún más preferentemente al menos un 95%) con una secuencia nucleótida que se muestra en la presente como SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 63 o SEQ ID No. 24; o es una secuencia nucleótida que se relaciona con SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 63, SEQ ID No. 24 por degeneración del código genético; o es una secuencia nucleótida que  
45 hibrida en condiciones de rigurosidad media o alta en una secuencia nucleótida que se muestra en la presente como SEQ ID No. 120, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 63 o SEQ ID No. 24.

En una realización preferida, la variante de la lípido aciltransferasa se codifica mediante una secuencia de ácido nucleico (preferentemente un ácido nucleico aislado o recombinante) que hibrida en condiciones de rigurosidad media o alta sobre sustancialmente toda la longitud de SEQ ID No. 49 o SEQ ID No. 120 o un complemento de SEQ ID No. 49 o SEQ ID No. 120, donde el polipéptido codificado que comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados de Q, H, N, T, F, Y o C en posición 31; R, Y, S, V, I, A, T, M, F, C o L en posición 86; R, G, H, K, Y, D, N, V, C, Q, L, E, S o F en posición 27; H, R, D, E 85; T o I en posición 119; K o E en posición 120; S, L, A, F, W, Y, R, H, M o C en posición 122; R en posición 201; S en posición 245; A o V en posición 235; G o S en posición 232; G o E en posición 236, donde las posiciones son posiciones de aminoácido equivalentes respecto de SEQ ID No. 16.

55 La variante de lípido aciltransferasa puede comprender un pro-péptido o un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa y comprende una secuencia de aminoácido que es al menos un 90% (preferentemente, al menos un 95%, más preferentemente al menos un 98%, más preferentemente al menos un 99%) idéntica a la secuencia de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 16 o 68 y comprende una o más modificaciones en una o más de las

siguientes posiciones: 27, 31, 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 232, 235 y/o 236 (preferentemente, en la posición 27, 31, 85, 86, 119 y/o 120, más preferentemente en la posición 27 y/o 31).

5 En una realización, la variante comprende un pro-péptido o un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa y comprende una secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 16 o 68, excepto por una o más modificaciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 31, 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 232, 235 y/o 236 (preferentemente, en la posición 27, 31, 85, 86, 119 y/o 120, más preferentemente en la posición 27 y/o 31).

10 En otra realización, la lípido aciltransferasa comprende un pro-péptido o un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa y comprende una secuencia de aminoácido que es al menos un 90% (preferentemente, al menos un 95%, más preferentemente al menos un 98%, más preferentemente al menos un 99%) idéntica a la secuencia de aminoácido que aparece como SEQ ID No. 16 o 68 y comprende una o más modificaciones en posiciones 27 y/o 31 en combinación con al menos otra modificación, donde la numeración de la posición se define como la posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que aparece en la presente como SEQ ID No. 6.

15 Adecuadamente, al menos otra modificación puede estar en una o más de las siguientes posiciones 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 23, 81, 82, 289, 227, 229, 233, 33, 207, 130, donde la numeración de la posición se define como aquella posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16.

20 En una realización preferida, la lípido aciltransferasa comprende un pro-péptido o un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa y comprende una secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 16 o 68, excepto por una o más modificaciones en una o más de las siguientes posiciones: 27 y/o 31 en combinación con al menos otra modificación.

25 Adecuadamente, al menos otra modificación puede tener lugar en una o más de las siguientes posiciones 85, 86, 122, 119, 120, 201, 245, 23, 81, 82, 289, 227, 229, 233, 33, 207 y/o 130, donde la numeración de la posición se define como la posición que, cuando se alinea sobre la base de la estructura primaria o terciaria, corresponde a la misma posición de la enzima que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16.

30 La lípido aciltransferasa puede ser un pro-péptido que se somete a una modificación post-translacional a un péptido maduro, es decir, un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa. A modo de ejemplo, únicamente SEQ ID No. 68 es igual que SEQ ID No. 16, excepto porque SEQ ID No. 68 ha pasado por una modificación post-translacional y/o post-transcripciones para remover algunos aminoácidos, más específicamente 38 aminoácidos. Por lo tanto, el polipéptido que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 podría considerarse en algunas circunstancias (es decir, en algunas células huésped) como un pro-péptido, que se procesa en un péptido maduro mediante modificación post-translacional y/o post-transcripcional. Las modificaciones precisas, p.ej., los sitios de escisión, respecto de la modificación post-translacional y/o post-transcripcional pueden variar ligeramente dependiente de las especies huésped. En algunas especies huésped, puede no haber modificación post-translacional y/o post-transcripcional, por lo tanto el pro-péptido sería equivalente al péptido maduro (es decir, un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa). Sin estar limitados por la teoría, los sitios de escisión pueden cambiar por unos pocos residuos (p.ej., 1, 2, o 3 residuos) en cualquier dirección en comparación con el sitio de escisión mostrado por referencia a SEQ ID No. 68 en comparación con SEQ ID No. 16. En otras palabras, más que escisión en la posición 235-ATR a la posición 273 (RRSAS) por ejemplo, la escisión puede comenzar en el residuo 232, 233, 234, 235, 236, 237 o 238, por ejemplo. Asimismo o alternativamente, la escisión puede finalizar en el residuo 270, 271, 272, 273, 274, 275 o 276 por ejemplo. Asimismo o alternativamente, la escisión puede resultar en la remoción de aproximadamente 38 aminoácidos, en algunas realizaciones, la escisión puede resultar en la remoción de entre 30 y 45 residuos, como por ejemplo 34 a 42 residuos, como por ejemplo de 36 a 40 residuos, preferentemente 38 residuos.

45 En algunas realizaciones, para establecer homología con la estructura primaria, la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa se compara directamente con la enzima lípido aciltransferasa que se muestra en la presente como secuencia primaria SEQ ID No. 16 o 68, y particularmente con un conjunto de residuos conocidos por no variar en todas o casi todas las lípido aciltransferasas para las cuales se conocen las secuencias. Después de alinear los residuos conservados, permitiendo inserciones y eliminaciones necesarias para mantener alineación (es decir, evitar la eliminación de residuos conservados a través de eliminación e inserción arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de SEQ ID No. 16 o 68. En las realizaciones preferidas, la alineación de los residuos conservados conserva el 100% de dichos residuos. Sin embargo, la alineación de más de un 75% o de tan poco como un 60% de los residuos conservados también es adecuada para definir residuos equivalentes. En realizaciones preferidas, se mantiene la conservación de residuos de serina catalítica e histidina. Los residuos conservados se utilizan para definir los residuos de aminoácido equivalentes correspondientes de la lípido aciltransferasa que se muestra en SEQ ID No. 16 o 68 en otras lípido aciltransferasas, como por ejemplo, de otras especies *Aeromonas*, así como también otros organismos.

Para alinear una lípido aciltransferasa progenitora con SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68 (la secuencia de referencia), se puede utilizar la alineación de secuencia como la alineación de pares (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>). Por lo tanto, se pueden determinar y modificar los aminoácidos

equivalentes en polipéptidos aciltransferasa progenitores alternativos, que corresponden a uno o más de los aminoácidos definidos con referencia a SEQ ID No. 68 o SEQ ID No. 16. Como el entendido en la técnica entenderá, cuando se utiliza la alineación de pares grabado, las configuraciones estándar suelen ser suficientes. Se pueden identificar residuos correspondientes utilizando una «aguja» para hacer una alineación que cubra toda la longitud de las dos secuencias. Sin embargo, también es posible encontrar la mejor región de similitud entre dos secuencias, utilizando «agua».

Alternativamente, particularmente en instancias donde la lípido aciltransferasa progenitora comparte una homología de secuencia principal baja con SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68, los aminoácidos correspondientes en la lípido aciltransferasa alternativa, que corresponden a uno o más de los aminoácidos definidos con referencia a SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68, pueden determinarse mediante alineación estructural al modelo estructural de SEQ ID No. 68 o SEQ ID No. 16, preferentemente SEQ ID No. 68.

Por lo tanto, los residuos equivalentes se pueden definir determinando una homología al nivel de la estructura terciaria para una lípido aciltransferasa cuya estructura terciaria ha sido determinada por cristalografía de rayos X. En este contexto, «residuos equivalentes» se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de cadena principal de un residuo de aminoácido particular de la lípido aciltransferasa que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 o 68 (N en N, CA en CA, C en C, y O en O) se encuentran dentro de 0,13 nm y preferentemente 0,1 nm después de la alineación. La alineación se logra después de la orientación y posicionamiento del mejor modelo para generar la superposición máxima de las coordenadas atómicas de los átomos de proteína no hidrógenos de la lípido aciltransferasa en cuestión y la lípido aciltransferasa que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 o 68. Como se conoce en la técnica, el mejor modelo es el modelo cristalográfico que da lugar al factor R más bajo para los datos de difracción experimental a la mayor resolución disponible. Los residuos equivalentes que son funcional y/o estructuralmente análogos a un residuo específico de la lípido aciltransferasa como se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 o 68 se definen como aquellos aminoácidos de la lípido aciltransferasa que adoptan, preferentemente, una conformación tal que alteran, modifican o modulan la estructura proteica para ejecutar cambios en la especificación del sustrato, p.ej., vinculación y/o catálisis del sustrato en una forma definida y atribuida a un residuo específico de la lípido aciltransferasa que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 o 68. Además, son aquellos residuos de la lípido aciltransferasa (en casos donde se ha obtenido una estructura terciaria mediante cristalografía de rayos x), que ocupan una posición análoga en la medida que, aunque los átomos de cadena principal del residuo determinado pueden no satisfacer los criterios de equivalencia sobre la base de ocupar una posición homóloga, las coordenadas atómicas de al menos dos de los átomos de cadena lateral del residuo recaen en 0,13 nm de los átomos de cadena lateral correspondientes de la lípido aciltransferasa que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 o 68.

Las coordenadas de la estructura tridimensional de la lípido aciltransferasa que se muestra en la presente como SEQ ID No. 68 (que es una lípido aciltransferasa *Aeromonas salmonicida* que comprende una mutación N80D) se describen en PCT/IB2009/054535 y encuentran uso en determinar residuos equivalentes en el nivel de la estructura terciaria.

Hay una gran inserción en la aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* entre la última hebra beta y el motivo ASP-X-X\_HIS cuando se compara con tioesterasa *E. coli* estructuralmente similar. Esta inserción crea una gran cavidad (en adelante, denominada «cueva» que une la cadena alifática del intermedio de la enzima acilo. Modular la secuencia y el tamaño de esta región deriva en una «cueva» o cavidad más grande o más pequeña para la cadena alifática del intermedio de la enzima acilo, es decir, la cadena acilo que se transfiere mediante la enzima. Por lo tanto, las enzimas de esta familia pueden estar diseñadas para transferir, preferiblemente, las cadenas acilo de diferentes longitudes.

Se encuentran cuatro inserciones en la lípido aciltransferasa *Aeromonas salmonicida* en relación con la tioesterasa *E. coli* (entrada PDB 1IVN) que unen elementos estructurales secundarios comunes a ambas estructuras.

Las coordenadas de aminoácidos de estas inserciones en la lípido aciltransferasa que se muestran como SEQ ID No. 68 se enumeran en la siguiente Tabla:

Tabla: Inserciones en la lípido aciltransferasa

Inserción	Residuos
Inserción 1	22-36
Inserción 2	74-88
Inserción 3	162-168
Inserción 4	213-281

Como se describe en detalle en PCT/IB2009/054535 en la lípido aciltransferasa, existe una gran superficie a la que el sustrato se puede unir que se puede dividir en dos áreas que se separan por Ser 16 y His 291, donde Ser 16 y His

291 junto con Asp288 forman la tríada catalítica característica. Estas dos áreas se pueden caracterizar como canal profundo o «quebrada» - en adelante denominadas «quebrada» - lo que deriva en una cavidad cerrada o «cueva» que pasa a través de la molécula.

Los residuos que forman la quebrada se enumeran en la siguiente Tabla:

5

Tabla: Residuos de QUEBRADA;

Inserción 1	M23, M27, Y30, L31
Segmento 1	F42, G67, G68
Inserción 2	D80, P81, K82, Q84, V85, I86
Segmento 2a	Y117, A119, Y120
Inserción 4	G229, Y230, V231

Los residuos que forman la cueva se enumeran en la siguiente Tabla.

Tabla: Residuos de CUEVA;

Segmento 1	D15, S16, L18
Segmento 2	W111, A114, L115, L118
Segmento 3	P156, D157, L158, Q160, N161
Segmento 4	F206, A207, E208, M209, L210
Segmento 5	M285, F286, V290, H291, P292 V295

10

Los segmentos 3 y 4 anteceden las inserciones 3 y 4 respectivamente y el segmento 5 sigue inmediatamente la inserción 4. Las inserciones 4 y 5 también contribuyen con el mayor acercamiento que deriva en la cueva, por lo tanto la cueva es diferente de la quebrada en que las inserciones 1 y 2 forman el revestimiento de la quebrada, mientras que las inserciones 3 y 4 forman la estructura superpuesta. Las inserciones 3 y 4 cubren la cueva.

En una realización la lípido aciltransferasa para uso en la presente invención se puede alterar modificando los residuos de aminoácido en uno o más de la quebrada, la cueva, la inserción 1, la inserción 2, la inserción 3 o la inserción 4.

15

En una realización la lípido aciltransferasa para uso en la presente invención se puede alterar modificando los residuos de aminoácido en uno o más de la quebrada, la inserción 1 o la inserción 2.

20

En una realización, las dimensiones de la cavidad vinculante de la cadena acilo de una lípido aciltransferasa se pueden alterar cambiando los residuos de aminoácido para formar la cueva más grande. Esto se puede lograr modulando el tamaño de las regiones que unen las características comunes de la estructura secundaria anteriormente descrita. En particular, el tamaño de la cueva se puede alterar cambiando los aminoácidos en la región entre la última hebra beta (quinta) de la enzima y el motivo Asp-X-X-His que forma parte de la tríada catalítica.

El segmento que determina la especificidad de la longitud de cadena del sustrato de una lípido aciltransferasa es una región de aminoácidos contiguos que recae entre la cepa  $\beta_5 \beta$  de la enzima y el residuo Asp de la tríada catalítica de dicha enzima (el residuo Asp es parte del motivo Asp-Xaa-Xaa-His).

25

Las estructuras terciarias de la lípido aciltransferasa *Aeromonas salmonicida* t la tioesterasa *E. coli* (depositadas como base de datos Genbank de NCB con en número de ingreso 1IVN\_A; GID:33357066) cada una de las cuales muestra una estructura alfa/beta/alfa de tres capas, donde las láminas beta están compuestas de cinco hebras paralelas, permiten que se determinen los segmentos que determinan la especificidad de la longitud de cadena del sustrato de cada una de las enzimas lípido aciltransferasa.

30

El segmento que determina la especificidad de longitud de cadena del sustrato de la lípido aciltransferasa *Aeromonas salmonicida* recae inmediatamente en N-terminal en el residuo Asp de la tríada catalítica de la enzima. Sin embargo, la longitud del segmento que determina la especificidad de la longitud de cadena del sustrato puede variar de conformidad con la distancia entre el residuo Asp y la hebra  $\beta_5 \beta$  de la enzima. Por ejemplo, los segmentos que determinan la especificidad de longitud de cadena del sustrato de la lípido aciltransferasa son aproximadamente 13 amino, 19 aminoácidos y aproximadamente 70 aminoácidos en longitud respectivamente. Como tales, dependiendo de la lípido aciltransferasa, un segmento que determina la especificidad de la longitud de cadena del sustrato puede oscilar entre 10 y 70 aminoácidos en longitud, p.ej., entre 10 y 30 aminoácidos en longitud, 30 a 50 aminoácidos en longitud, o 50 a 70 aminoácidos.

35

## ES 2 645 041 T3

La siguiente tabla brinda una secuencia ejemplar para el segmento que determina la especificidad de longitud de cadena del sustrato de la enzima lípido aciltransferasa.

Lípido aciltransferasa <i>A. salmonicida</i> (GCAT)	
AEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVWKPFATRSV STDRQLSASPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSA SPLNCEGKMF	SEQ ID No. 124

5 En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácido de un segmento que determina la especificidad de longitud de cadena del sustrato puede ser una secuencia de aminoácido de una enzima silvestre o no. En algunas realizaciones, el segmento que determina la especificidad de la longitud de cadena del sustrato puede tener una secuencia de aminoácido que es al menos un 70%, p.ej., al menos un 80%, al menos un 90%, o al menos un 95% idéntica al segmento que determina la especificidad de la longitud de cadena del sustrato de una lípido aciltransferasa silvestre.

Adecuadamente, se puede preparar una variante de enzima utilizando una mutagénesis dirigida al sitio.

10 Las modificaciones preferidas se ubican en una o más de las siguientes posiciones L031, I086, M027, V085, A119, Y120, W122, E201, F235, W232, A236, y/o Q245.

En particular, las modificaciones clave incluyen una o más de las siguientes modificaciones: L31Q, H, N, T, F, Y o C (preferentemente, L31 Q); M27R, G, H, K, Y, D, N, V, C, Q, L, E, S o F (preferentemente, M27V); V85H, R, D o E; I86R, Y, S, V, I, A, T, M, F, C o L (preferentemente, I86S o A); A119T o I; Y120K o E; W122S, L o A (preferentemente, W122L); E201R; Q245S; F235A o V; W232G o S; y/o A236G o E.

15 En una realización cuando se produce al menos una modificación en la quebrada, las modificaciones se producen en una o más de las siguientes posiciones: 31, 27, 85, 86, 119, 120.

20 En particular, las modificaciones clave en la quebrada incluyen una o más de las siguientes modificaciones: L31Q, H, N, T, F, Y o C (preferentemente, L31 Q); M27R, G, H, K, Y, D, N, V, C, Q, L, E, S o F (preferentemente, M27V); V85H, R, D o E; I86R, Y, S, V, I, A, T, M, F, C o L (preferentemente, I86S o A); A119T o I; Y120K o E, que pueden estar en combinación con la otra y/o en combinación con otra modificación.

En una realización, preferentemente cuando la modificación se realiza en el sitio de inserción 1, las modificaciones se producen en una o más posiciones 31 y/o 27. Adecuadamente, las modificaciones pueden ser L31 Q, H, N, T, F, Y o C (preferentemente, L31 Q) y/o M27R, G, H, K, Y, D, N, V, C, Q, L, E, S o F (preferentemente, M27V).

25 En una realización, preferentemente cuando la modificación se realiza en el sitio de inserción 2, las modificaciones se producen en las posiciones 085, 086. Adecuadamente, las modificaciones pueden ser V85H, R, D o E y/o I86R, Y, S, V, I, A, T, M, F, C o L.

En una realización, preferentemente cuando la modificación se realiza en el sitio de inserción 4, las modificaciones se producen en la posición 245. Adecuadamente, la modificación puede ser Q245S.

En una realización, preferentemente la modificación se produce en al menos el sitio de inserción 1.

30 En otra realización, preferentemente la modificación se produce en al menos el sitio de inserción 1 en combinación con otra modificación en el sitio de inserción 2 y/o 4 y/o en una o más de las siguientes posiciones 119, 120, 122, 201, 77, 130, 82, 120, 207, 167, 227, 215, 230, 289.

35 En otra realización, preferentemente la modificación se produce en al menos la región de quebrada en combinación con otra modificación en el sitio de inserción o 4 y/o en una o más de las siguientes posiciones 122, 201, 77, 130, 82, 120, 207, 167, 227, 215, 230, 289.

A continuación, se brindan las modificaciones preferidas para un sitio particular:

R130R, V, Q, H, A, D, L, I, K, N, C, Y, G, S, F, T o M;

K82R, N, H, S, L, E, T, M o G;

G121S, R, G, E, K, D, N, V, Q o A;

40 Y74Y o W;

Y83 F o P;

I77T, M, H, Q, S, C, A, E, L, Y, F, R o V;

## ES 2 645 041 T3

A207E;

Q167T, H, I, G, L o M;

D227L, C, S, E, F, V, I, T, Y, P, G, R, D, H o A;

N215G;

5 Y230A, G, V, R, I, T, S, N, H, E, D, Q, K; o

N289P.

En combinación con una o más modificaciones en las posiciones 31, 27, 85, 86, 119, 120, 122, 201, 245, 235, 232, y/o 236 (por ejemplo, la modificación puede ser una o más de las siguientes: L31Q, H, N, T, F, Y o C (preferentemente, L31 Q); M27R, G, H, K, Y, D, N, V, C, Q, L, E, S o F (preferentemente, M27V); V85H, R, D o E; I86R, Y, S, V, I, A, T, M, F, C o L (preferentemente, I86S o A); A119T o I; Y120K o E; W122S, L o A (preferentemente, W122L); E201 R; Q245S; F235A o V; W232G o S; y/o A236G o E) adecuadamente, la variante de lípido aciltransferasa puede modificarse adicionalmente en una o más de las siguientes posiciones 130, 82, 121, 74, 83, 77, 207, 167, 227, 215, 230, 289 (por ejemplo, la modificación adicional puede ser una o más de las siguientes: R130R, V, Q, H, A, D, L, I, K, N, C, Y, G, S, F, T o M; K82R, N, H, S, L, E, T, M o G; G121S, R, G, E, K, D, N, V, Q o A; Y74Y o W; Y83 F o P; I77T, M, H, Q, S, C, A, E, L, Y, F, R o V; A207E; Q167T, H, I, G, L o M; D227L, C, S, E, F, V, I, T, Y, P, G, R, D, H o A; N215G; Y230A, G, V, R, I, T, S, N, H, E, D, Q, K; y/o289P), preferentemente, la variante de lípido aciltransferasa puede modificarse adicionalmente en al menos una o más de las siguientes posiciones: 130, 82, 77 o 227.

Para evitar dudas, la cadena principal de la lípido aciltransferasa cuando se alinea (en una base primaria o terciaria) con la enzima lípido aciltransferasa que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16, tiene, preferentemente D en posición 80. Por lo tanto, hemos demostrado en muchas de las combinaciones descritas en la presente N80D como una modificación. Si no se menciona N80D como una modificación adecuada y la cadena progenitora no comprende D en posición 80, entonces se debería incorporar una modificación adicional de N80D en la variante de lípido aciltransferasa para garantizar que la variante comprenda D en la posición 80.

Cuando la cadena principal o lípido aciltransferasa progenitora ya contiene la modificación N80D, las otras modificaciones se pueden expresar sin hacer referencia a la modificación N80D, es decir, L31Q, N80D, W122L se pueden expresar como L31Q, W122L por ejemplo.

Sin embargo, es importante nota que la modificación N80D es una modificación preferida y una enzima de cadena principal o progenitora se utiliza, preferentemente, y ya posee un aminoácido D en posición 80. Si, sin embargo, se utiliza una cadena principal que no contiene un aminoácido D en posición (como por ejemplo, una o más lípido aciltransferasas que se muestran en la presente como SEQ ID No. 1, 3, 4, 15, 34, 0 35), entonces se incluye, preferentemente, una modificación adicional de N80D.

Adecuadamente, la sustitución en posición 31 identificada por alineación de la secuencia progenitora con SEQ ID No. 68 o SEQ ID No. 16 puede ser una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de: Q, H, Y y F, preferentemente Q.

Adecuadamente, la variante de polipéptido comprende una o más modificaciones en una o más posiciones de residuo de aminoácido: 27, 77, 80, 82, 85, 85, 86, 121, 122, 130, 167, 207, 227, 230 y 289, cuya posición se identifica por alineación de la secuencia progenitora con SEQ ID No. 68. Adecuadamente, al menos una de una o más de otras modificaciones puede estar en una posición de residuo de aminoácido: 86, 122 o 130, cuya posición se identifica por alineación de la secuencia progenitora con SEQ ID No. 68.

Adecuadamente, la variante de lípido aciltransferasa comprende una o más de las siguientes sustituciones: I86 (A, C, F, L, M, S, T, V, R, I o Y); W122 (S, A, F, W, C, H, L, M, R o Y); R130 A, C, D, G, H, I, K, L, M, N, Q, T, V, R, F o Y); o cualquier modificación de estas.

La variante de lípido aciltransferasa puede comprender una de las siguientes combinaciones de modificaciones (donde la cadena progenitora ya comprende aminoácido D en posición 80, la modificación se puede expresar sin referencia a N80D);

L31Q, N80D, I86S, W122F

L31Q, N80D, W122L

L31 Q, N80D, I86V, W122L

L31Q, N80D, I86I, W122L

50 L31Q, N80D, I86S, R130R

## ES 2 645 041 T3

- L31Q, N80D, K82R, I86A
- L31Q, N80D, I86S, W122W
- L31Q, N80D, I86S, W122Y
- M27V, L31Q, N80D
- 5 L31Q, N80D, I86A, W122L
- L31Q, N80D, W122L
- L31Q, N80D, I86S, G121S
- L31Q, N80D, I86S
- L31Q, N80D, K82R, I86S
- 10 L31Q, N80D, I86S, W122L, R130Y
- L31Q, N80D, I86S, W122L, R130V
- L31Q, N80D, I86S
- L31Q, N80D, I86T, W122L
- L31Q, N80D, I86S, W122L
- 15 L31Q, N80D, W122L, R130Q
- L31Q, N80D, I86S, W122L, R130R
- L31Q, N80D, I86S
- L31Q, N80D, G121R
- L31Q, N80D, I86A
- 20 M27C, L31Q, N80D
- M27Q, L31Q, N80D
- L31Q, N80D, G121S
- L31Q, N80D, I86S, W122R
- L31Q, N80D, R130Q
- 25 L31Q, N80D, I86S, W122H
- L31Q, N80D, I86M, W122L
- L31Q, N80D, R130N
- L31Q, N80D, I86S, W122L
- L31Q, N80D, K82N
- 30 L31Q, N80D, I86S, W122M
- L31Q, N80D, W122L
- L31Q, N80D, K82H
- L31Q, N80D, R130H
- L31Q, N80D, R130A
- 35 L31Q, N80D, G121S
- L31Q, N80D, I86S, W122L, R130D
- L31Q, N80D, I86M

# ES 2 645 041 T3

- L31Q, Y74Y, N80D
- L31Q, N80D, R130L
- L31Q, N80D, Y83F
- L31Q, N80D, K82S
- 5 L31Q, I77T, N80D
- L31Q, N80D, I86S, W122L, R130I
- L31Q, N80D, I86S, W122L
- L31Q, N80D, I86F, W122L
- M27N, L31Q, N80D
- 10 L31Q, N80D, Y83P
- L31Q, N80D, R130K
- L31Q, N80D, K82R, I86S, W122L
- L31Q, N80D, K82L
- L31Q, N80D, I86S, G121G
- 15 L31Q, N80D, I86A, R130Q
- M27H, L31Q, N80D
- L31Q, N80D, W122L, A207E
- L31Q, N80D, W122L, R130L
- L31Q, N80D, K82E
- 20 L31Q, N80D, G121E
- L31Q, N80D, W122L, R130R
- L31Q, I77M, N80D
- L31Q, N80D, K82T
- L31Q, N80D, W122L
- 25 L31Q, N80D, W122H
- L31Q, N80D, Q167T
- L31Q, I77H, N80D
- L31Q, N80D, G121K
- L31Q, I77Q, N80D
- 30 L31Q, N80D, W122L, R130N
- L31Q, N80D, W122L
- L31 Q, N80D, G121D
- L31Q, N80D, R130T
- L31Q, N80D, R130T
- 35 L31Q, N80D, K82M
- L31Q, N80D, Q167H
- L31Q, N80D, I86T

## ES 2 645 041 T3

- L31Q, N80D, Q167I
- L31Q, N80D, I86C
- L31Q, N80D, Q167G
- M27L, L31Q, N80D
- 5 L31Q, N80D, I86S, G121R
- L31Q, I77S, N80D
- L31Q, I77C, N80D
- L31Q, N80D, G121N
- L31Q, I77A, N80D
- 10 L31Q, N80D, R130M
- L31Q, N80D, W122F
- M27G, L31Q, N80D
- L31Q, N80D, K82G
- L31Q, N80D, I86S, W122L, R130K
- 15 L31Q, N80D, R130A
- L31Q, N80D, I86I
- L31Q, I77E, N80D
- L31Q, N80D, D227L
- L31Q, N80D, V85H, N215G
- 20 L31Q, N80D, I86A, W122L, R130N
- L31Q, I77R, N80D
- L31Q, N80D, I86F
- L31Q, N80D, I86Y, W122L
- M27K, L31Q, N80D
- 25 L31Q, N80D, D227C
- L31Q, N80D, R130L
- L31Q, N80D, I86C, W122L
- L31Q, N80D, Q167L
- L31Q, N80D, V85H
- 30 L31Q, N80D, Q167M
- M27D, L31Q, N80D
- L31Q, N80D, I86L
- L31 Q, N80D, Y230A
- L31 Q, N80D, W122R
- 35 L31Q, N80D, Y230G
- L31Q, N80D, D227S
- L31Q, N80D, W122L, A207E, N289P

## ES 2 645 041 T3

- L31 Q, N80D, W122Y  
L31Q, N80D, I86L, W122L  
L31Q, N80D, K82R, I86S, G121S, R130Q  
L31Q, Y74W, N80D
- 5 L31Q, N80D, R130F  
L31Q, N80D, G121V  
L31Q, N80D, W122L, R130M  
L31Q, N80D, R130V  
L31Q, N80D, Y230V
- 10 L31Q, N80D, N215G  
L31Q, N80D, I86S, W122L, R130N  
L31Q, N80D, Y230R  
M27E, L31Q, N80D  
L31Q, N80D, Y230I
- 15 L31Q, N80D, I86S, W122L, R130S  
L31Q, N80D, K82R  
L31Q, N80D, D227E  
L31Q, N80D, K82R, I86A, G121S  
L31Q, N80D, R130G
- 20 L31Q, I77V, N80D  
L31Q, N80D, G121G  
L31Q, N80D, Y230T  
L31Q, N80D, K82R, I86S, R130N  
L31Q, N80D, D227F
- 25 L31Q, N80D, I86A, G121R  
L31Q, N80D, I86S, R130N  
L31Q, N80D, W122C  
L31Q, N80D, Y230S  
L31Q, N80D, R130Y
- 30 L31Q, N80D, R130C  
L31Q, I77L, N80D  
A119T, N80D  
A199A, N80D  
G67A, N80D, V85H
- 35 donde dichas posiciones se identifican por alineación de la secuencia progenitora con SEQ ID No. 68, o SEQ ID No. 16.

Adecuadamente, la variante de lípido aciltransferasa puede ser idéntica a la lípido aciltransferasa progenitora excepto

por una modificación en la posición 31 y, opcionalmente, una o más modificaciones en una o más de las posiciones de residuo de aminoácido: 27, 77, 80, 82, 85, 85, 86, 121, 122, 130, 167, 207, 227, 230 y 289, cuya posición se identifica por alineación de la secuencia progenitora con SEQ ID No. 68, o SEQ ID No. 16.

5 Adecuadamente, la variante de lípido aciltransferasa puede ser idéntica a la lípido aciltransferasa progenitora excepto por una modificación en la posición 31 y, opcionalmente, una o más modificaciones en una o más de las posiciones de residuo de aminoácido: 86, 122 o 130, cuya posición se identifica por alineación de la secuencia progenitora con SEQ ID No. 68 o SEQ ID No. 16.

10 En una realización, donde la secuencia progenitora es SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 60, o donde la secuencia progenitora se codifica mediante SEQ ID No. 49 o SEQ ID No. 120, la variante de polipéptido tiene una de las modificaciones como se detalló anteriormente, excepto por una modificación en la posición 80. En este sentido, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 68 o un polipéptido codificado por SEQ ID No. 49 o SEQ ID No. 120 ya tendrá ácido aspártico en la posición 80, cuando dichas posiciones se identifican por alineación de la secuencia progenitora con SEQ ID No. 16.

15 Adecuadamente, la variante de lípido aciltransferasa o la variante de lípido aciltransferasa obtenible mediante un procedimiento de conformidad con la presente invención podrá tener una identidad de al menos un 75% con la lípido aciltransferasa progenitora, adecuadamente, la variante de lípido aciltransferasa podrá tener una identidad de al menos un 75% o al menos un 80% o al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un 95% o al menos un 98% respecto de la lípido aciltransferasa progenitora.

20 La presente invención se relaciona también con una variante de polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa, donde la variante comprende una modificación en al menos la posición 31 en comparación con una lípido aciltransferasa, donde la posición 31 se identifica por alineación con SEQ ID No. 68 o SEQ ID No. 16.

En una realización, la variante de lípido aciltransferasa tiene, preferentemente, las siguientes modificaciones y/o las siguientes modificaciones se realizan en el procedimiento de la presente invención:

25 • L31Q, N80D, W122L (que se pueden expresar como L31Q, W122L donde la enzima de cadena principal ya tiene D en posición 80);

• M27V, L31Q, N80D (que se pueden expresar como N27V, L31Q donde la enzima de cadena principal ya tiene D en posición 80);

• L31Q, N80D, K82R, I86A (que se pueden expresar como L31Q, K82R, I86A donde la enzima de cadena principal ya tiene D en posición 80); y/o

30 • L31Q, N80D, I86S, W122F (que se pueden expresar como L31Q, I86S, W122F donde la enzima de cadena principal ya tiene D en posición 80).

#### Propiedades mejoradas

La variante de lípido aciltransferasa para uso en la presente invención tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con una lípido aciltransferasa progenitora (es decir, de cadena principal) o no modificada.

35 El término «propiedad mejorada» como se utiliza en la presente puede incluir a) una especificidad de sustrato alterada de la lípido aciltransferasa, por ejemplo, y a modo de ejemplo únicamente i) una capacidad alterada de las enzimas para utilizar algunos compuestos como aceptadores, por ejemplo, una capacidad mejorada para utilizar un carbohidrato como una molécula aceptadora mejorando así la capacidad de las enzimas para producir un éster de carbohidrato) o ii) una capacidad de alteración para utilizar ácidos grasos saturados o insaturados como un sustrato o

40 iii) una especificidad cambiada de forma tal que la variante de lípido aciltransferasa utiliza preferentemente el ácido graso de la posición Sn1 o Sn2 de un sustrato lipídico o iv) una especificidad de longitud de cadena del sustrato alterada de la variante de enzima; b) cinéticas alteradas de la enzima; y/o c) menor capacidad de la variante de lípido aciltransferasa para realizar una reacción de hidrólisis a la vez que mantiene o mejora la capacidad de la enzima para llevar a cabo la reacción aciltransferasa.

45 Otras propiedades mejoradas pueden incluir, por ejemplo, aquellas relacionadas con mejoras y/o cambios en el pH y/o en la estabilidad de la temperatura, y/o estabilidad del detergente y/o estabilidad oxidativa. Es más, se contempla que las enzimas que tienen varios grados de estabilidad en una o más de estas características (pH, temperatura, estabilidad proteolítica, estabilidad de detergente, y/o estabilidad oxidativa) se pueden preparar de conformidad con la presente invención.

50 La caracterización de las proteínas naturales (p.ej., lípido aciltransferasa progenitora) y mutantes (p.ej., variantes de lípido aciltransferasa) se logra mediante cualquier vía adecuada y se basa preferentemente en la evaluación de las propiedades de interés.

En algunas realizaciones, la variante de enzima de la presente invención, cuando se compara con la enzima progenitora, puede tener mayor actividad transferasa y a la vez la misma actividad hidrolítica o una actividad

hidrolítica menor. En otras palabras, la variante de enzima puede tener una actividad transferasa más alta que la actividad hidrolítica (p.ej., actividad transferasa: actividad hidrolítica) en comparación con la enzima progenitora. Adecuadamente, la variante de enzima puede transferir, preferentemente, un grupo acilo de un lípido (que incluye fosfolípido, galactolípido, o triacilglicerol) a un aceptador acilo en lugar de simplemente hidrolizar el lípido.

- 5 Adecuadamente, la lípido aciltransferasa para uso en la invención puede ser una variante con actividad enzimática mejorada en lípidos polares, preferentemente fosfolípidos y/o glucolípidos, cuando se compara con la enzima progenitora. Preferentemente, dichas variantes también tienen actividad baja o nula en los lípidos liso-polares. La actividad mejorada en los lípidos polares, preferentemente, los fosfolípidos y/o glucolípidos, puede ser el resultado de hidrólisis y/o actividad transferasa o una combinación de ambos. Preferentemente, la actividad mejorada en los lípidos polares en el resultado de la actividad transferasa.

Las variantes de lípido aciltransferasas para uso en la invención pueden tener menor actividad en triglicéridos, y/o monoglicéridos y/o diglicéridos en comparación con la enzima progenitora.

Adecuadamente, la variante de enzima puede no tener actividad en triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos.

Definición de conjuntos

- 15 Conjunto de aminoácido 1:

Conjunto de aminoácido 1 (nótese que estos son aminoácidos en 11VN - Figura 53 y Figura 54) Gly8, Asp9, Ser10, Leu11, Ser12, Tyr15, Gly44, Asp45, Thr46, Glu69, Leu70, Gly71, Gly72, Asn73, Asp74, Gly75, Leu76, Gln106, Ile107, Arg108, Leu109, Pro110, Tyr113, Phe121, Phe139, Phe140, Met141, Tyr145, Met151, Asp154, His157, Gly155, Ile156, Pro158

- 20 Los motivos altamente conservados como GDSx y residuos catalíticos, se eliminaron del conjunto 1 (residuos subrayados). Para evitar dudas, el conjunto 1 define los residuos de aminoácido en 10Å del átomo de carbono central de un glicerol en el sitio activo del modelo 11VN.

Conjunto de aminoácido 2:

- 25 Conjunto de aminoácido 2 (nótese que la numeración de los aminoácidos hace referencia a los aminoácidos en la secuencia madura P10480)

Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289 y Val290.

Los residuos seleccionados en el Conjunto 1 en comparación con el Conjunto 2 se muestran en la Tabla 1.

Modelo IVN		P10480
IVN	Homólogo de A.hid.	Residuo de secuencia madura
	PFAM	Estructura
		Número
Gly8	Gly32	
Asp9	Asp33	
Ser10	Ser34	
Leu11	Leu35	Leu17
Ser12	Ser36	Ser18
		Lys22
		Met23
Tyr15	Gly58	Gly40
Gly44	Asn98	Asn80
Asp45	Pro99	Pro81
Thr46	Lys100	Lys82
		Asn87
		Asn88
Glu69	Trp129	Trp111

ES 2 645 041 T3

Modelo IVN			P10480
IVN	Homólogo de A.hid.		Residuo de secuencia madura
	PFAM	Estructura	Número
Leu70	Val130		Val112
Gly71	Gly131		
Gly72	Ala132		Ala114
Asn73	Asn133		
Asp74	Asp134		
Gly75	Tyr135		Tyr117
Leu76	Leu136		Leu118
Gln106		Pro174	Pro156
Ile107		Gly177	Gly159
Arg108		Gln178	Gln160
Leu109		Asn179	Asn161
Pro110		180 to 190	Pro162
Tyr113			Ser163
			Ala164
			Arg165
			Ser166
			Gln167
			Lys168
			Val169
			Val170
			Glu171
			Ala172
Phe121	His198	Tyr197	Tyr179
		His 198	His180
		Asn199	Asn181
Phe139	Met227		Met209
Phe140	Leu228		Leu210
Met141	Arg229		Arg211
Tyr145	Asn233		Asn215
			Lys284
Met151	Met303		Met285
Asp154	Asp306		
Gly155	Gln307		Gln289
Ile156	Val308		Val290
His157	His309		
Pro158	Pro310		

Conjunto de aminoácido 3:

El conjunto de aminoácido 3 es idéntico al conjunto 2 pero se refiere a la secuencia codificante de *Aeromonas*

*salmonicida* (SEQ ID No. 35), es decir los números de residuo de aminoácido son 18 más en el conjunto 3 dado que refleja la diferencia entre la numeración de aminoácido en la proteína madura (SEQ ID No. 35) en comparación con la proteína que incluye una secuencia señal (SEQ ID No. 4).

5 Las proteínas maduras de *Aeromonas salmonicida* GDSX (SEQ ID No. 35) y *Aeromonas hydrophila* GDSX (SEQ ID No. 34) difieren en cinco aminoácidos. Estos son Thr3Ser, LYS182Gln, Glu309Ala, Thr310Asn, y Gly318-, donde el residuo *salmonicida* se enumera en primer lugar y el residuo *hydrophila* se enumera en último lugar. La proteína *hydrophila* solo tiene 317 aminoácidos en longitud y carece de un residuo en posición 318. GDSX de *Aeromonas salmonicida* tiene actividad considerablemente alta en los lípidos polares como sustratos galactolípidos que la proteína *Aeromonas hydrophila*. El barrido de sitio se realizó en todas las cinco posiciones de aminoácido.

10 Conjunto de aminoácido 4:

Conjunto de aminoácido 4 es S3, Q182, E309, S310, y -318.

Conjunto de aminoácido 5:

F13S, D15N, S18G, S18V, Y30F, D116N, D116E, D157 N, Y226F, D228N Y230F.

Conjunto de aminoácido 6:

15 El conjunto de aminoácido 6 es Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn 87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318.

20 La numeración de los aminoácidos en el conjunto 6 se refiere a los residuos de aminoácidos en P10480 (SEQ ID No. 3) - los aminoácidos correspondientes en otras cadenas de secuencia se pueden determinar mediante alineación de homología y/o alineación estructural con P10480 y/o 1IVN.

Conjunto de aminoácido 7:

25 El conjunto de aminoácido 7 es Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn 87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318, Y30X (donde X se selecciona de A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W), Y226X (donde X se selecciona de A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W), Y230X (donde X se selecciona de A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W), S18X (donde X se selecciona de A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W o Y), D157X (donde X se selecciona de A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y).

30 La numeración de los aminoácidos en el conjunto 7 se refiere a los residuos de aminoácidos en P10480 (SEQ ID No. 3) - los aminoácidos correspondientes en otras cadenas de secuencia se pueden determinar mediante alineación de homología y/o alineación estructural con P10480 y/o 1IVN ).

35 Adecuadamente, la variante de enzima comprende una o más de las siguientes modificaciones de aminoácido en comparación con la enzima progenitora:

S3E, A, G, K, M, Y, R, P, N, T o G

E309Q, R o A, preferentemente Q o R

-318Y, H, S o Y, preferentemente Y.

40 Preferentemente, X del motivo GDSX es L. Por lo tanto, preferentemente, la enzima progenitora comprende el motivo de aminoácido GDLSL.

45 Adecuadamente, la primera lípido aciltransferasa progenitora puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácido: SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35.

50 Adecuadamente, la segunda lípido aciltransferasa relacionada puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácido: SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35.

- La variante de enzima debe comprender al menos una modificación de aminoácido en comparación con la enzima progenitora. En algunas realizaciones, la variante de enzima puede comprender al menos 2, preferentemente al menos 3, preferentemente al menos 4, preferentemente al menos 5, preferentemente al menos 6, preferentemente al menos 7, preferentemente al menos 8, preferentemente al menos 9, preferentemente al menos 10 modificaciones de aminoácido en comparación con la enzima progenitora.
- 5 Cuando se hace referencia a residuos de aminoácido específicos en la presente, la numeración es aquella obtenida de la alineación de la variante de secuencia con la secuencia de referencia que se muestra como SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35.
- En un aspecto, la variante de enzima preferentemente comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido:
- 10 S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o  
L17A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
S18A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, o Y; y/o  
K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
- 15 M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
Y30A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o  
G40A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
- 20 K82A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
W111A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
- 25 A114C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
Y117A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o  
L118A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
P156A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
- 30 G159A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
Q160A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
N161A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; y/o  
P162A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
S163A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o
- 35 A164C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
R165A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, o Y; y/o  
S166A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o  
Q167A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
K168A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
- 40 V169A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o

- V170A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o  
 E171A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 A172C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
- 5 H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 N181A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; y/o  
 Q182A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y, preferentemente K; y/o  
 M209A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
- 10 R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 Y226A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o  
 Y230A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W; y/o  
 K284A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
- 15 M285A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 V290A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o  
 E309A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o  
 S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y.
- 20 Además, o alternativamente a ello, puede haber una o más extensiones C-terminal. Preferentemente, la extensión adicional C-terminal está comprendida de uno o más aminoácidos alifáticos, preferentemente un aminoácido no polar, más preferentemente de I, L, V o G. Por lo tanto, la presente invención proporciona una variante de enzima que comprende una o más de las siguientes extensiones C-terminal: 3181, 318L, 318V, 318G.
- 25 Las variantes de enzima preferidas pueden tener menor actividad hidrolítica frente a un fosfolípido, como fosfatidilcolina (PC), y también pueden tener una mayor actividad transferasa de un fosfolípido.
- Las variantes de enzima preferidas pueden tener mayor actividad transferasa de un fosfolípido, como fosfatidilcolina (PC), y también pueden tener una mayor actividad hidrolítica frente a un fosfolípido.
- La modificación de uno o más de los siguientes residuos puede derivar en una variante de enzima que tiene mayor actividad transferasa absoluta frente al fosfolípido:
- 30 S3, D157, S310, E309, Y179, N215, K22, Q289, M23, H180, M209, L210, R211, P81, V112, N80, L82, N88; N87
- Las modificaciones preferidas específicas que pueden brindar una variante de enzima que tiene actividad transferasa mejorada de un fosfolípido pueden seleccionarse de una o más de las siguientes:
- S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y; preferentemente N, E, K, R, A, P o M, más preferentemente S3A
- 35 D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente D157S, R, E, N, G, T, V, Q, KorC  
 S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y; preferentemente S310T -318 E  
 E309A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y; preferentemente E309 R, E, L, R o A  
 Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W; preferentemente Y179 D, T, E, R, N, V, K, Q o S, más preferentemente E, R, N, V, K o Q
- 40 N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N215 S, L, R o Y  
 K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente K22 E, R, C o A

Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y; preferentemente Q289 R, E, G, PorN  
M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente M23 K, Q, L, G, TorS  
H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente H180 Q, R o K  
M209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente M209 Q, S, R, A, N, Y, E, V o L  
5 L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente L210 R, A, V, S, T, I, W o M  
R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W o Y; preferentemente R211T  
P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente P81G  
V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y; preferentemente V112C  
N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N80 R, G, N, D, P, T, E, V, A o G  
10 L82A, C, D, E, F, G, H, I, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente L82N, S o E  
N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N88C  
N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N87M o G

La modificación preferida de uno o más de los siguientes residuos deriva en una variante de enzima que tiene mayor actividad transferasa absoluta frente al fosfolípido:

- 15 S3 N, R, A, G  
M23 K, Q, L, G, T, S  
H180 R  
L82 G  
Y179 E, R, N, V, K o Q  
20 E309 R, S, L o A

Una modificación preferida es N80D. Este es el caso particularmente cuando se utiliza la secuencia de referencia SEQ ID No. 35, como la cadena principal. Por lo tanto, la secuencia de referencia puede ser SEQ ID No. 16. Esta modificación puede ser en combinación con una o más de otras modificaciones. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa que comprende SEQ ID No. 35, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de un 75% o más, preferentemente un 85% o más, más preferentemente un 90% o más, aún más preferentemente un 95% o más, aún más preferentemente un 90% o más, o aún más preferentemente un 99% o más con SEQ ID No. 35.

30 Como se indicó anteriormente, cuando se hace referencia a residuos de aminoácido específicos en la presente, la numeración es aquella obtenida de la alineación de la variante de secuencia con la secuencia de referencia que se muestra como SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35.

35 Por preferencia, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y usos de la presente invención puede codificar un lípido que comprende la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 16, o una secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 68, o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad del 70% o más, preferentemente del 75% o más, preferentemente del 85% o más, más preferentemente, del 90% o más, aún más preferentemente del 95% o más, aún más preferentemente del 98% o más, o aún más preferentemente del 99% o más con la SEQ ID No. 16 o la SEQ ID No. 68. Esta enzima puede considerarse una variante de enzima.

40 En una realización preferida, la variante de enzima comprende uno de SEQ ID No. 121, SEQ ID No. 122 o SEQ ID No. 123.

45 A los efectos de la presente invención, el grado de identidad se basa en el número de elementos de secuencia que son iguales. El grado de identidad de conformidad con la presente invención para secuencias de aminoácido se puede determinar adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica como Vector NTI 10 (Invitrogen Corp.). Para la alineación de pares, la puntuación utilizada es preferentemente BLOSUM62 con una penalización por apertura de un hueco de 10,0 y una penalización por extensión de un hueco de 0,1.

Adecuadamente, el grado de identidad respecto de una secuencia de aminoácido se determina sobre al menos 20

aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 30 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 40 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 50 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 60 aminoácidos contiguos.

5 Adecuadamente, el grado de identidad respecto de una secuencia de aminoácido se puede determinar sobre toda la secuencia.

Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa o enzima lípido aciltransferasa para uso en la presente invención se puede obtener, preferentemente se obtiene, de un organismo de uno o más de los siguientes géneros: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*,  
10 *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* y *Corynebacterium*.

Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa o enzima lípido aciltransferasa para uso en la presente invención se puede obtener, preferentemente se obtiene, de un organismo de uno o más de los siguientes géneros: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*,  
15 *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis* *Lactobacillus helveticus*, *Desulfotobacterium dehalogenans*, *Bacillus sp*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*,  
20 *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* y *Corynebacterium efficiens*.

En un aspecto, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención codifica, preferentemente una enzima lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención y se puede obtener, preferentemente se obtiene o deriva, de uno o más de *Aeromonas spp.*, *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida*.

25 En un aspecto, la lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención es una enzima lípido aciltransferasa que se puede obtener, preferentemente se obtiene o deriva, de uno o más de *Aeromonas spp.*, *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida*.

Las enzimas cuya función como lípido aciltransferasas de conformidad con la presente invención se puede identificar habitualmente utilizando el ensayo descrito en la presente, a continuación:

30 Ensayo para la actividad transferasa

La actividad transferasa se mide preferentemente mediante la cantidad molar de éster de colesterol formado por la transferencia acilo de fosfolípidos y/o lípidos en leche al colesterol en relación con la cantidad de colesterol disponible originalmente.

35 La leche se incuba con enzima o agua (como control) durante 30 minutos a 40°C. Los lípidos de la lecha se aíslan mediante extracción del disolvente y los lípidos aislados se analizan mediante GLC.

Sobre el análisis GLC, la cantidad de colesterol (CHL), el éster de colesterol (CHLE) y los ácidos grasos (FFA) se calculan de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Transferasa} = \frac{\text{CHLE}(t) - \text{CHLE}(0)}{\text{CHLE}(t) - \text{CHLE}(0) + \text{FFA}(t) - \text{FFA}(0)} \times 100$$

donde

40 CHLE(O) = mol/l de éster de colesterol (control)

CHLE(t) = mol/l de éster de colesterol (tratamiento enzimático)

FFA(O) = mol/l de ácidos grasos libres (control)

FFA(t) = mol/l de ácidos grasos libres (tratamiento enzimático)

45 El análisis GLC se puede llevar a cabo de conformidad con el siguiente Ejemplo 5; Utilizando este ensayo, las lípidoaciltransferasas/lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención son aquellas que tienen al menos un 5% de actividad transferasa, preferentemente al menos un 10% de actividad transferasa, preferentemente al menos un 15%, un 20%, un 25%, un 26%, un 28%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60% o un 70% de actividad transferasa.

El término «transferasa» como se utiliza en la presente es intercambiable con el término «lípidico aciltransferasa».

Adecuadamente, la lípidico aciltransferasa como se define en la presente, cataliza una o más de las siguientes reacciones: interesterificación, transesterificación, alcoholólisis, hidrólisis.

5 El término «interesterificación» se refiere a la transferencia catalizada enzimática de los grupos acilo entre un donador de lípidos y un aceptador de lípidos, donde el donador de lípidos no es un grupo acilo libre.

El término «transesterificación» como se utiliza en la presente significa la transferencia catalizada enzimática de un grupo acilo de un donador de lípidos (diferente del ácido graso libre) a un aceptador acilo (diferente de agua).

10 Como se utiliza en la presente, el término «alcoholólisis» se refiere a la escisión enzimática de un enlace covalente de un derivado ácido mediante reacción con un alcohol ROH para que uno de los productos combine con H del alcohol y el otro producto combine con el grupo OR del alcohol.

Como se utiliza en la presente, el término «alcohol» se refiere a un compuesto alquilo que contiene un grupo hidroxilo.

Como se utiliza en la presente, el término «hidrólisis» se refiere a la transferencia catalizada enzimática de un grupo acilo de un lípidico al grupo OH de una molécula de agua.

15 El término «sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres» como se utiliza en la presente significa que, preferentemente, la lípidico acil transferasa de conformidad con la presente invención tiene un 100% de actividad transferasa (es decir, transfiere un 100% de los grupos acilo de un donador acilo al aceptador acilo, sin actividad hidrolítica); sin embargo, la enzima puede transferir menos de un 100% de los grupos acilo presentes en el donador acilo de lípidos al aceptador acilo. En cuyo caso, la actividad aciltransferasa representa, preferentemente, al menos un 5%, más preferentemente al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente al menos un 30%, más preferentemente al menos un 40%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente al menos un 60%, más preferentemente al menos un 70%, más preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90%, y más preferentemente al menos un 98% de la actividad enzimática total. El % de actividad transferasa (es decir, la actividad transferasa como un porcentaje de la actividad enzimática total) se puede determinar mediante el siguiente «Ensayo de actividad transferasa» que se describe a continuación.

25 En algunos aspectos de la presente invención, el término «sin aumento sustancial de los ácidos grasos libres» como se utiliza en la presente significa que la cantidad de ácido graso libre en un aceite comestible tratado con una lípidico aciltransferasa de conformidad con la presente invención, es menor que la cantidad de ácido graso libre producido en el aceite comestible cuando se ha utilizado una enzima distinta de una lípidico aciltransferasa de conformidad con la presente invención, como por ejemplo, en comparación con la cantidad de ácido graso libre producido cuando se ha utilizado una enzima fosfolipasa convencional, por ejemplo, Lecitasa Ultra™ (Novozymes A/S, Dinamarca).

30 La enzima de conformidad con la presente invención se puede utilizar con una o más de otras enzimas de grado alimenticio adecuadas. Por lo tanto, dentro del alcance de la invención, además de la enzima de la invención, se agrega otra al menos otra enzima al alimento. Dichas otras enzimas incluyen enzimas degradadoras de almidón como endo- o exoamilasas, pululaninas, enzimas desramificadoras, hemicelulasas que incluyen xilanasas, celulasas, óxidoreductasas, por ejemplo, peroxidasas, fenol oxidasas, glucosa oxidasa, piranosas oxidadas, sulfhidril oxidada, o una carbohidrato oxidada como una que oxida maltosa, por ejemplo, hexosa oxidada (HOX), lipasas, fosfolipasas, glucolipasas, galactolipasas y proteasas.

40 En una realización, la enzima puede ser Dairy HOX™, la cual actúa como un eliminador de oxígeno para prolongar la vida útil del queso a la vez que realiza control de tostado en hornos para pizza. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de una enzima capaz de reducir la reacción de Maillard en un alimento (ver WO 02/39828), como un producto lácteo, por ejemplo queso, donde la enzima es, preferentemente, una enzima oxidante de maltosa como por ejemplo, carbohidrato oxidada, glucosa oxidada y/o hexosa oxidada, en el proceso de preparar un material alimenticio y/o un alimento de conformidad con la presente invención.

45 En una realización preferida, la lípidico aciltransferasa se utiliza en combinación con una lipasa que tiene una o más de las siguientes actividades lipasa: actividad glucolipasa (E.C. 3.1.1.26, actividad triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3), actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4), o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32). Adecuadamente, las enzimas lipolíticas son bien conocidas en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, las siguientes enzimas lipolíticas: LIPOPAN® F, LIPOPAN® XTRA y/o LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipasa A2 (por ejemplo, fosfolipasa A2 de LIPOMOD™ 22L de Biocatalysts, LIPOMAX™ de Genencor), LIPOLASE® (Novozymes A/S, Dinamarca), YIELDMAX™ (Chr. Hansen, Dinamarca), PANAMORE™ (DSM), las lipasas descritas en WO 03/97835 , EP 0 977 869 o EP 1 193 314 . Esta combinación de una lípidico aciltransferasa como se define en la presente y una lipasa puede ser particularmente preferida en masa o productos de panadería, o en productos alimenticios finos como tortas y dulces.

55 En algunas realizaciones, también puede ser beneficioso combinar el uso de una lípidico aciltransferasa con una enzima lipolítica como una pasta de cuajo de estómagos de ternero, cordero o Palatase A750L (Novo), Palatase M200L (Novo), Palatase M1000 (Novo), o Piccantase A (DSM), y también Piccantase de fuentes animales de DSM (K,

KL, L & C) o Lipomod 187, Lipomod 338 (biocatalizadores). Estas lipasas se utilizan, convencionalmente, en la producción de queso para producir sabores de queso. Estas lipasas también se pueden utilizar para producir alimentos enzimáticamente modificados, por ejemplo, un producto lácteo (por ejemplo, queso), particularmente donde dicho producto lácteo consiste de, se produce de o comprende grasa láctea. Una combinación de la lípido aciltransferasa con una o más de estas lipasas puede tener un efecto beneficioso en el sabor del producto lácteo (por ejemplo, queso).

El uso de lipasas en combinación con la enzima de la invención puede ser particularmente ventajoso en instancias donde se puede desear la combinación de ácidos grasos libres, por ejemplo, en queso donde los ácidos grasos libres pueden impartir un sabor deseable, o en la preparación de alimentos. El entendido en la técnica podrá combinar proporciones de enzimas lipolíticas, por ejemplo, LIOPAN<sup>®</sup> F, LIOPAN<sup>®</sup> XTRA y/o LECITASE<sup>®</sup> ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipasa A2 (por ejemplo, fosfolipasa A2 de LIPOMOD<sup>™</sup> 22L de Biocatalysts, LIPOMAX<sup>™</sup> de Genencor), LIPOLEASE<sup>®</sup> (Novozymes A/S, Dinamarca), YIELDMAX<sup>™</sup> (Chr. Hansen, Dinamarca), PANAMORE<sup>™</sup> (DSM), las lipasas mencionadas en WO 03/97835 , EP 0 977 869 o EP 1 193 314 y la lípido aciltransferasa de la presente invención para proporcionar la relación deseada de actividad hidrolítica y actividad transferasa que resulta en un efecto técnico preferido o una combinación de efectos técnicos en el alimento (como aquellos enumerados en la presente en «Efectos técnicos»).

También puede ser beneficioso combinar el uso de lípido aciltransferasa con una fosfolipasa, como fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa B, fosfolipasa C y/o fosfolipasa D.

El uso combinado se puede realizar de forma secuencial o concurrente, por ejemplo, el tratamiento de lípido aciltransferasa puede ocurrir antes o durante el tratamiento enzimático. Alternativamente, el tratamiento enzimático puede tener lugar antes o durante el tratamiento de lípido aciltransferasa.

En el caso de los tratamientos enzimáticos secuenciales, en algunas realizaciones, puede ser ventajoso remover la primera enzima utilizada, por ejemplo, por desactivación con calor o mediante el uso de una enzima inmovilizada, antes del tratamiento con la segunda (y/o tercera, etc.) enzima.

Modificaciones post-transcripcionales y posteriores a la transcripción

Adecuadamente, la lípido aciltransferasa de conformidad con la invención se puede codificar mediante una de las secuencias nucleótidas aquí descritas.

De acuerdo con la célula huésped utilizada, se pueden realizar modificaciones post-transcripcionales y/o post-transcripcionales. Se prevé que la lípido aciltransferasa para uso en los presentes procedimientos y/o usos abarca lípido aciltransferasas que han sufrido modificación post-transcripcional y/o post-translacional.

A modo de ejemplo únicamente, la expresión de la secuencia nucleótida que se muestra en la presente como SEQ ID No. 49 (ver Figura 57) en una célula huésped (como por ejemplo, *Bacillus licheniformis*) deriva en las modificaciones post-transcripcionales y/o post-transcripcionales que generan la secuencia de aminoácido que se muestra en la presente como SEQ ID No. 68 (ver Figura 73).

SEQ ID No. 68 es igual que la SEQ ID No. 16 (que se muestra en la presente en la Figura 1) excepto porque la SEQ ID No. 68 ha sufrido modificación post-translacional y/o post-transcripcional para remover 38 aminoácidos.

SEQ ID NO. 16 también puede modificarse en forma post-transcripcional y/o post-translacional para remover 39, 40 o 41 amino como se muestra en SEQ ID No. 121, 122 y 123 respectivamente.

Aislada

En un aspecto, la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa recuperada/aislada. Por lo tanto, la lípido aciltransferasa producida puede estar en una forma aislada.

En otro aspecto, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede estar en forma aislada.

El término «aislado» significa que la secuencia o proteína es al menos sustancialmente libre de al menos otro componente que con el cual la secuencia o proteína se asocia naturalmente y como se encuentra en la naturaleza.

Purificada

En un aspecto, la lípido aciltransferasa puede estar en forma purificada.

En otro aspecto, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede estar en forma purificada.

El término «purificada» significa que la secuencia está en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente un 51% puro, o al menos aproximadamente un 75% puro, o al menos aproximadamente un 80%

puro o al menos aproximadamente un 90% puro, o al menos aproximadamente un 95% puro o al menos un 98% puro.

Clonación de una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido de conformidad con la presente invención

5 Una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente o un polipéptido que es adecuado para modificación, se puede aislar de una célula u organismo que produce dicho polipéptido. Hay varios procedimientos conocidos en la técnica para el aislamiento de las secuencias nucleótidas.

10 Por ejemplo, un ADN genómico y/o una genoteca de ADNc se pueden construir utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce el polipéptido. Si la secuencia de aminoácido del polipéptido es conocida, las sondas oligonucleótidas etiquetadas se podrán sintetizar y utilizar para identificar clones que codifican polipéptido de la genoteca genómica preparada a partir del organismo. Alternativamente, una sonda oligonucleótida etiquetada que contiene secuencias homólogas a un gen polipéptido conocido se podría utilizar para identificar clones que codifican polipéptidos. En este último caso, se utilizan condiciones de hibridación y lavado de menor rigurosidad.

15 Alternativamente, los clones que codifican polipéptido se podrían identificar insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, como un plásmido, transformando la bacteria gram negativa con la genoteca de ADN genómico resultante y colocando la bacteria transformada en agar que contiene una enzima inhibida por el polipéptido, permitiendo así que se identifiquen los clones que expresan el polipéptido.

20 En aún otra alternativa, la secuencia nucleótida que codifica el polipéptido se puede preparar sintéticamente mediante procedimientos estándar establecidos, por ejemplo, el procedimiento de fosforamidita descrito por Beucage S.L. et al (1981) Tetrahedron Letters 22, p 1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes et al (1984) EMBO J. 3, p 801-805. En el procedimiento de fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, recosen, ligan y clonan en vectores correspondientes.

25 La secuencia nucleótida puede ser de origen genómico y sintético mixto, origen sintético mixto y de ADNc, o de origen genómico mixto y ADNc, preparada mediante el ligado de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según corresponda) de conformidad con técnicas estándar. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia nucleótida entera. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos, por ejemplo, como aquellas descritas en US 4,683,202 o en Saiki R K et al (Science (1988) 239, pp 487-491).

Secuencias nucleótidas

30 La presente invención también abarca secuencias nucleótidas que codifican polipéptidos que tienen propiedades específicas como se define en la presente. El término «secuencia nucleótida» como se utiliza en la presente se refiere a una secuencia oligonucleótida o secuencia polinucleótida, y variante, homólogos, fragmentos y derivados de esta (como por ejemplo porciones). La secuencia nucleótida puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, la cual puede ser mono o bicatenaria ya sea que represente la hebra sentido o antisentido.

35 El término «secuencia nucleótida» en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente, significa ADN, más preferentemente, ADNc para la secuencia codificante.

40 En una realización preferida, la secuencia nucleótida en sí misma que codifica un polipéptido que tiene propiedades específicas como se define en la presente no cubre la secuencia nucleótida nativa en su entorno natural cuando se liga a sus secuencias naturalmente asociadas que también se encuentran en su ámbito natural. A los efectos de facilitar la referencia, denominaremos esta realización preferida la «secuencia nucleótida no nativa». En este sentido, el término «secuencia nucleótida nativa» significa una secuencia nucleótida entera que está en su ámbito nativo y cuando se une funcionalmente a un promotor entero con el que se asocia naturalmente, cuyo promotor también está en su ámbito nativo. Por lo tanto, el polipéptido de la presente invención se puede expresar mediante secuencia nucleótida en su organismo nativo pero donde la secuencia nucleótida no está bajo el control del promotor con el que se asocia naturalmente en dicho organismo.

45 Preferentemente, el polipéptido no es un polipéptido nativo. En este sentido, el término «polipéptido nativo» significa todo un polipéptido que está en su ámbito nativo y cuando ha sido expresado por su secuencia nucleótida nativa.

50 Típicamente, la secuencia nativa que codifica polipéptidos que tienen las propiedades específicas como se define en la presente, se prepara utilizando técnicas de ADN recombinante (es decir ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia nucleótida se puede sintetizar, en todo o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (ver Caruthers MH et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 and Horn T et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

Revolución molecular

Una vez que la secuencia nucleótida que codifica una enzima se ha aislado, o una secuencia nucleótida que codifica una enzima putativa ha sido identificada, puede ser deseable modificar la secuencia nucleótida seleccionada, por

ejemplo, puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una enzima de conformidad con la presente invención.

Se pueden introducir mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleótidas que flanquean los sitios de mutación deseados.

5 Un procedimiento adecuado se divulga en Morinaga et al (Biotechnology (1984) 2, p646-649). Otro procedimiento de introducción de mutaciones en secuencias nucleótidas que codifican una enzima se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151).

10 En lugar de la mutagénesis dirigida al sitio, como se describió anteriormente, se pueden introducir mutaciones al azar utilizando un kit comercial como el kit de mutagénesis GeneMorph PCR de Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria Diversify PCR de Clontech. EP 0 583 265 hace referencia a procedimientos de optimización de mutagénesis basada en PCR, la cual también se puede combinar con el uso de análogos de ADN mutagénicos como aquellos descritos en EP 0 866 796 . Las tecnologías de PCR propensas a error son adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con características preferidas. WO0206457 se refiere a la evolución molecular de lipasas.

15 Un tercer procedimiento para obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias nucleótidas no idénticas, utilizando un número de enzimas de restricción o una enzima como DNasa I, y re ensamblar todas las secuencias nucleótidas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente, uno puede utilizar una secuencia nucleótida no idéntica o múltiples secuencias nucleótidas no idénticas e introducir mutaciones durante el re ensamblaje de la secuencia nucleótida completa. Las tecnologías de barajado de ADN y barajado de familia de ADN son adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con características preferidas. Los procedimientos adecuados para realizar el «barajado» se encuentran en EP0 752 008 , EP1 138 763 , EP1 103 606 . El barajado también se puede combinar con otras formas de mutagénesis de ADN como se describe en US 6,180,406 y WO 01/34835.

25 Por lo tanto, es posible producir numerosas mutaciones aleatorias o dirigidas al sitio en una secuencia nucleótida, ya sea *in vivo* o *in vitro* y hacer una prueba posterior para detectar la funcionalidad mejorada del polipéptido modificado por muchos medios. Con el uso de procedimientos de recombinación *in silicio* y *exo* mediada (ver WO 00/58517 , US 6,344,328 , US 6,361,974 ), por ejemplo, se puede producir una evolución molecular donde la variante producida retiene una homología muy baja respecto de enzimas o proteínas conocidas. Dichas variantes así obtenidas pueden tener una analogía estructural significativa con las enzimas transferasa conocidas, pero una homología de secuencia de aminoácido muy baja.

30 Como ejemplo no limitante, las mutaciones o variantes naturales de una secuencia polinucleótida se pueden recombinar con las mutaciones naturales u otras mutaciones o variantes naturales para producir nuevas variantes. Dichas nuevas variantes también se pueden analizar para detectar una mejor funcionalidad del polipéptido codificado.

35 La aplicación de los procedimientos de evolución molecular anteriormente mencionados y similares permite la identificación y selección de variantes de las enzimas de la presente invención que tienen características preferidas sin conocimiento previo de la estructura o función proteica y permite la producción de mutaciones o variantes no predecibles pero beneficiosas. Existen numerosos ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la técnica para la optimización o alteración de la actividad enzimática; dichos ejemplos incluyen, a modo no taxativo, uno o más de los siguientes: expresión optimizada y/o actividad en una célula huésped o *in vitro*, mayor actividad enzimática, especificidad de producto y/o sustrato alterada, mayor o menor estabilidad enzimática o estructural, actividad/especificidad enzimática alterada en condiciones ambientales preferidas, por ejemplo, temperatura, pH, sustrato.

Como será evidente para un entendido en la técnica, el uso de herramientas de evolución molecular permite alterar una enzima para mejorar la funcionalidad de la enzima.

45 Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa utilizada en la invención puede codificar una variante de lípido aciltransferasa, es decir, la lípido aciltransferasa puede contener al menos una sustitución de aminoácido, eliminación o adición, cuando se compara con la enzima progenitora. Las variantes de enzima retienen al menos una homología de un 1%, un 2%, un 3%, un 5%, un 10%, un 15%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 95%, un 97%, un 99% con la enzima progenitora. Adecuadamente, las enzimas progenitoras pueden incluir una enzima con actividad esterasa o lipasa. Preferentemente, la enzima progenitora se alinea con la secuencia de consenso pfam00657.

En una realización preferida, una variante de enzima lípido aciltransferasa retiene o incorpora al menos uno o más de los residuos de aminoácido de la secuencia de consenso pfam00657 que se encuentran en los bloques GDSx, GANDY y HPT.

55 Las enzimas como las lipasas sin actividad lípido aciltransferasa o con actividad lípido aciltransferasa baja en un entorno acuoso pueden mutar utilizando herramientas de evolución molecular para introducir o mejorar la actividad transferasa, produciendo así una enzima lípido aciltransferasa con actividad transferasa significativa para uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención.

Adecuadamente, la secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno de los procedimientos y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa que puede ser una variante con actividad enzimática mejorada en lípidos polares, preferentemente fosfolípidos y/o glucolípidos, cuando se compara con la enzima progenitora. Preferentemente, dichas variantes también tienen actividad baja o nula en los lípidos lisopolares. La actividad mejorada en los lípidos polares, los fosfolípidos y/o glucolípidos, puede ser el resultado de hidrólisis y/o actividad transferasa o una combinación de ambos.

Las variantes de lípido aciltransferasas pueden tener menor actividad en triglicéridos, y/o monoglicéridos y/o diglicéridos en comparación con la enzima progenitora.

Adecuadamente, la variante de enzima puede no tener actividad en triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos.

Alternativamente, la variante de enzima puede tener mayor actividad sobre los triglicéridos y/o puede tener mayor actividad en uno o más de los siguientes, lípidos polares, fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina, glucolípidos, digalactosil monoglicérido, monogalactosil monoglicérido.

Las variantes de lípido aciltransferasas son conocidas, y una o más de dichas variantes pueden ser adecuados en los procedimientos y usos de conformidad con la presente invención y/o en las composiciones enzimáticas de conformidad con la presente invención. A modo de ejemplo únicamente, las variantes de lípido aciltransferasas se describen en las siguientes referencias y se pueden utilizar de conformidad con la presente invención: Hilton & Buckley J. Biol. Chem. 1991 Jan 15: 266 (2): 997-1000; Robertson et al J. Biol. Chem. 1994 Jan 21; 269(3):2146-50; Brumlik et al J. Bacteriol. 1996 Apr; 178 (7): 2060-4; Peelman et al Protein Sci. 1998 Mar; 7(3):587-99.

Secuencias de aminoácido

La presente invención también hace referencia al uso de la secuencias de aminoácido codificadas por una secuencia nucleótida, la cual codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno o más de los procedimientos y/o usos de la presente invención.

Como se utiliza en la presente, el término «secuencia de aminoácido» es sinónimo del término «polipéptido» y/o el término «proteína». En algunas circunstancias, el término «secuencia de aminoácido» es sinónimo del término «péptido».

La secuencia de aminoácido se puede preparar/aislar de una fuente adecuada, o puede producirse sintéticamente o puede prepararse mediante uso de técnicas de ADN recombinante.

Adecuadamente, las secuencias de aminoácido se pueden obtener de los polipéptidos aislados descritos en la presente mediante técnicas estándar.

Un procedimiento adecuado para determinar secuencias de aminoácido de polipéptidos aislados es el siguiente:

El polipéptido purificado se puede liofilizar y 100 µg del material liofilizado se puede disolver en 50 µl de una mezcla de 8 M de urea y 0,4M de bicarbonato de amonio, pH 8.4. La proteína disuelta se puede desnaturalizar y reducir durante 15 minutos a 50°C tras la superposición con nitrógeno y adición de 5 µl de 45 mM de ditiotreitól. Después de enfriar a temperatura ambiente, se pueden agregar 5 µl de 100 mM de iodoacetamida para los residuos de cisteína para que se deriven durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con nitrógeno.

Se pueden agregar 135 µl de agua y 5 µg de endoproteinasa Lys-C en 5 µl de agua a la mezcla de reacción anterior y la digestión se puede producir a 37°C en nitrógeno durante 24 horas.

Los péptidos resultantes se pueden separar mediante HPLC de fase inversa en una columna VYDAC C18 (0,46x15cm; 10µm; The Separation Group, California, EE.UU.) utilizando disolvente A: Un 0,1% de TFA en agua y disolvente B: Un 0,1 % de TFA en acetonitrilo. Los péptidos seleccionados se pueden volver a someter a cromatografía en una columna Develosil C18 utilizando el mismo sistema de disolvente, antes de la secuenciación N-terminal. La secuenciación se puede realizar utilizando un secuenciador 476A de Applied Biosystems utilizando ciclos rápidos de líquido pulsado de conformidad con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, EE.UU.).

Identidad de secuencia u homología de secuencia

En este caso, el término «homólogo» significa una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácido diana y las secuencias nucleótidas diana. Aquí, el término «homología» se puede asimilar a «identidad».

La secuencia de aminoácido y/o la secuencia nucleótida homólogas deben proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o mejora la actividad de la enzima.

En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácido que puede ser al menos un 75%, un 85% o un 90% idéntica, preferentemente, al menos un 95% o un 98% idéntica a la secuencia diana. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., que la secuencia de

aminoácido diana. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención, se prefiere que exprese homología en términos de identidad de secuencia.

5 En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia nucleótida que puede ser al menos un 75%, un 85% o un 90% idéntica, preferentemente, al menos un 95% o un 98% idéntica a la secuencia nucleótida que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia diana). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., como la secuencia diana. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención, se prefiere que exprese homología en términos de identidad de secuencia.

10 Las comparaciones de homología se pueden realizar a ojo, o más comúnmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencia ya disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

15 El % de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo por vez. Esto se llama alineación «sin huecos». Típicamente, dichas alineaciones sin huecos se producen únicamente sobre un número relativamente bajo de residuos.

20 Aunque este es un procedimiento muy simple y constante, no toma en cuenta que, por ejemplo, en un par idéntico de secuencias, una inserción o eliminación puede hacer que los siguientes residuos de aminoácido sean eliminados de la alineación, generando posiblemente una reducción mayor en el % de homología cuando se realiza la alineación global. Consecuentemente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencia están diseñados para producir alineaciones óptimas que toman en cuenta posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar la puntuación de homología general indebidamente. Esto se logra insertando «huecos» en la secuencia de alineación para tratar de maximizar la homología local.

25 Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan «penalizaciones por hueco» a cada hueco que se produce en la alineación para que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con la menor cantidad de huecos posibles - que reflejen mayor relación entre las dos secuencias comparadas - logre una puntuación más alta que una con muchos huecos. «Costos por hueco afines» se utilizan generalmente para aplicar un costo relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente utilizado. Las penalizaciones por hueco altas producirán, por supuesto, alineaciones optimizadas con menor cantidad de huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten la modificación de las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores predeterminados cuando se utiliza dicho software para las comparaciones de secuencia.

35 El cálculo del % máximo de homología requiere, por lo tanto y en primer lugar, la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para realizar esta alineación es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de otros software que pueden realizar comparaciones de secuencia incluyen, a modo no taxativo, el paquete BLAST (ver Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18), y FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410). Tanto BLAST como FASTA están disponibles en la búsqueda offline y online (ver Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar el programa Vector NTI. También está disponible una nueva herramienta, denominada Secuencias BLAST 2 para comparar la secuencia proteica y la secuencia nucleótida (ver FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y [tatiana@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)).

45 Aunque el % de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineación en sí mismo no se basa típicamente en una comparación de pares de todo o nada. Al contrario, se suele utilizar una matriz de puntuación de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación de pares sobre la base de la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz que se utiliza comúnmente es la matriz BLOSUM62 - la matriz predeterminada para el conjunto de programas BLAST. Los programas Vector NTI suelen utilizar los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministra (ver el manual del usuario para más información). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar los valores predeterminados para el paquete Vector NTI.

50 Alternativamente, las homologías porcentuales se pueden calcular utilizando la función de alineación múltiple en Vector NTI (Invitrogen Corp.), sobre la base de un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

55 Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente hace esto como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

En caso que se utilicen penalizaciones por hueco cuando se determine la identidad de secuencia, entonces, preferentemente, se utilizarán los siguientes parámetros para la alineación de pares:

<b>PARA BLAST</b>			
APERTURA DE HUECO		0	
EXTENSIÓN DE HUECO		0	
<b>PARA CLUSTAL</b>	ADN	PROTEÍNA	
TAMAÑO DE PALABRA	2	1	Triple K
PENALIZACIÓN POR HUECO	15	10	
EXTENSIÓN DE HUECO	6,66	0,1	

En una realización, la identidad de secuencia para la secuencia nucleótida se determina, preferentemente, utilizando CLUSTAL con la penalización por hueco y extensión por hueco como se definieron anteriormente.

5 Adecuadamente, el grado de identidad respecto de una secuencia nucleótida se determina sobre al menos 20 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 30 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 40 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 50 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 60 nucleótidos contiguos, preferentemente sobre al menos 100 nucleótidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad respecto de una secuencia nucleótida se puede determinar sobre toda la secuencia.

10 En una realización, el grado de identidad de la secuencia de aminoácido de conformidad con la presente invención se puede determinar adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica como Vector NTI 10 (Invitrogen Corp.). Para la alineación de pares, la matriz utilizada es preferentemente BLOSUM62 con una penalización por apertura de un hueco de 10,0 y una penalización por extensión de un hueco de 0,1.

15 Adecuadamente, el grado de identidad respecto de una secuencia de aminoácido se determina sobre al menos 20 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 30 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 40 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 50 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 60 aminoácidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad respecto de una secuencia de aminoácido se puede determinar sobre toda la secuencia.

20 Las secuencias también pueden tener eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácido que producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácido deliberadas pueden realizarse sobre la base de la similitud en polaridad, cargo, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o naturaleza anfipática de los residuos en la medida que se retenga la actividad de enlace secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los  
25 aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos polares sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

30 Las sustituciones conservadoras se pueden realizar, por ejemplo, de conformidad con la siguiente Tabla 2. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente, en la misma línea en la tercera columna, se pueden sustituir entre sí:

Tabla 2

ALIFÁTICO	No polar	HUECO
		ILV
	Polar - sin carga	C S T M
		N Q
	Polar - con carga	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

La presente invención también abarca la sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se utilizan en la presente para hacer referencia al intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que se puede producir, es decir, sustitución igual a igual como base por base, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no

homóloga también se puede producir, es decir, de una clase de residuo a otra o alternativamente que incluye la inclusión de aminoácidos no naturales como ornitina (en adelante denominada Z), ornitina de ácido diaminobutírico (en adelante denominada B), norleucina ornitina (en adelante denominada O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

5 Los reemplazos también se pueden hacer por aminoácidos no naturales.

Las variantes de secuencias de aminoácido pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden insertar entre dos residuos de aminoácido de la secuencia que incluye grupos alquilo como grupos metilo, etilo, o propilo en adición a los espaciadores de aminoácido como residuos de glicina o  $\beta$ -alanina. Otra forma de variación, que incluye la presencia de uno o más residuos de aminoácido en forma peptóide, será bien entendida por el entendido en la técnica. Para evitar dudas, la «forma peptóide» se utiliza para hacer referencia a las variantes de residuos de aminoácido donde el grupo sustituyente  $\alpha$ -carbono está en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar de  $\alpha$ -carbono. Los procesos para preparar péptidos en la forma peptóide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

15 Las secuencias nucleótidas para uso en la presente invención o codificación de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Un número de tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos es conocido en la técnica. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. A los efectos de la presente invención, se debe entender que las secuencias nucleótidas descritas en la presente se pueden modificar por cualquier procedimiento disponible en la técnica. Dichas modificaciones se pueden producir para mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias nucleótidas.

20 La presente invención también abarca el uso de secuencias nucleótidas que son complementarias a las secuencias discutidas en la presente o cualquier derivado, fragmento o derivado de estas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de esta entonces dicha secuencia se puede utilizar como una sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

25 Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero recaen en el alcance de la invención se pueden obtener de muchas formas. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente se pueden obtener por ejemplo, explorando las genotecas de ADN de varias personas, por ejemplo, personas de distintas poblaciones. Asimismo, otros homólogos virales/bacterianos o celulares particularmente homólogos celulares que se encuentran en células mamíferas (por ejemplo, células de ratas, ratones, bovinos y primates) se pueden obtener y dichos homólogos y fragmentos de estos serán capaces, generalmente, de hibridar selectivamente en las secuencias que se muestran en el listado de secuencias de la presente invención. Dichas secuencias se pueden obtener explorando las genotecas de ADNc o las genotecas de ADN genómico hechas a partir de otras especies animales y explorando dichas genotecas con sondas que comprenden todo o parte de una de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos en condiciones de rigurosidad media o alta. Las consideraciones similares aplican a la obtención de homólogos de especies y variantes alélicas de las secuencias de polipéptido o secuencias nucleótidas de la invención.

30 Las variantes y homólogos de cepa/especie también se pueden obtener utilizando PCR degenerado que utilizará los cebadores diseñadas para apuntar a secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácido conservado en las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas se pueden predecir, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácido de varias variantes/homólogos. Las alineaciones de secuencia se pueden producir utilizando un software conocido en la técnica. Por ejemplo, se utiliza ampliamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

45 Los cebadores utilizados en PCR degenerado contendrán una o más posiciones de degeneración y se utilizarán en condiciones de rigurosidad menores que aquellas utilizadas para secuencias de clonación con cebadores de secuencia única frente a secuencias conocidas.

50 Alternativamente, dichos polinucleótidos se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil donde, por ejemplo, se requieren cambios a la secuencia de codón silencioso para optimizar las preferencias del codón para una célula huésped particular en la que se expresan las secuencias polinucleótidas. Otros cambios de secuencia pueden ser deseables para introducir sitios de reconocimiento del polipéptido de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. Los polinucleótidos (secuencias nucleótidas) de la invención se pueden utilizar para producir un cebador, por ejemplo, un cebador PCR, un cebador para una reacción de ampliación alternativa, una sonda, por ejemplo, etiquetada con una etiqueta reveladora mediante vías convencionales utilizando etiquetas radioactivas o no radioactivas, o los polinucleótidos se pueden clonar en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán al menos 15, preferentemente, al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 o 40 nucleótidos en longitud, y también están abarcadas por el término polinucleótidos de la invención como se utiliza en la presente.

Los polinucleótidos como los polinucleótidos de ADN y las sondas de conformidad con la presente invención se pueden producir en forma recombinante, sintética o mediante cualquier vía disponible para los entendidos en la

técnica. También se pueden clonar mediante técnicas estándar.

En general, los cebadores se producirán a través de medios sintéticos, que incluyen la fabricación en etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, de un nucleótido por vez. Las técnicas para lograr esto utilizando técnicas automáticas ya están disponibles en la técnica.

- 5 Los polinucleótidos más largos generalmente se producirán utilizando medios recombinantes, por ejemplo, utilizando PCR (reacción en cadena de la polimerasa), técnicas de clonación. Esto incluirá hacer un par de cebadores (por ejemplo, de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) flanqueando una región de la secuencia dirigida al lípido que se desea clonar, poniendo a los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenido de una célula animal o humana, mediante reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que producen ampliación de la región deseada, aislando el fragmento ampliado (por ejemplo, mediante purificación de la mezcla de reacción en gel de agarosa) y recuperando el ADN ampliado. Los cebadores se pueden diseñar para contener sitios de reconocimiento enzimático de restricción para que el ADN ampliado se clone en un vector de clonación adecuado.

#### Hibridación

- 15 La presente invención también abarca el uso de secuencias que son complementarias a las secuencias de la presente invención o secuencias que son capaces de hibridar en las secuencias de la presente invención o las secuencias que son complementarias a ellas.

El término «hibridación» como se utiliza en la presente incluirá «el proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través del emparejamiento» así como el proceso de ampliación que se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- 20 La presente invención también abarca el uso de secuencias nucleótidas que son capaces de hibridar en secuencias que son complementarias a las secuencias diana discutidas en la presente o cualquier derivado, fragmento o derivado de estas.

La presente invención también abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar en secuencias nucleótidas discutidas en la presente.

- 25 Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del complejo de unión nucleótido, como se describe en Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA), y confieren una «rigurosidad» definida como se explica a continuación.

- 30 La rigurosidad máxima se produce, generalmente a aproximadamente  $T_m - 5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ\text{C}$  debajo de la  $T_m$  de la sonda); rigurosidad alta a aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}$  debajo de  $T_m$ ; rigurosidad intermedia a aproximadamente  $10^\circ\text{C}$  a  $20^\circ\text{C}$  debajo de  $T_m$ ; y rigurosidad baja a aproximadamente  $20^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$  debajo de  $T_m$ . Como los entendidos en la técnica entenderán, una hibridación de rigurosidad máxima se puede utilizar para identificar o detectar secuencias nucleótidas idénticas mientras que una hibridación de rigurosidad intermedia (o baja) se puede utilizar para identificar o detectar secuencias polinucleótidas relacionadas o similares.

- 35 Preferentemente, la presente invención abarca el uso de secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones de rigurosidad alta o condiciones de rigurosidad intermedia en secuencias nucleótidas que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas como se define en la presente.

- 40 Más preferentemente, la presente invención abarca el uso de secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones de rigurosidad alta (por ejemplo,  $65^\circ\text{C}$  y  $0,1\times\text{SSC}$  { $1\times\text{SSC} = 0,15\text{ M NaCl}$ ,  $0,015\text{ M Na-citrato}$  pH 7.0}) en secuencias nucleótidas que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas como se define en la presente.

La presente invención también se relaciona con el uso de secuencias nucleótidas que pueden hibridar en secuencias nucleótidas discutidas en la presente (que incluyen secuencias complementarias de aquellas discutidas en la presente).

- 45 La presente invención también se relaciona con el uso de secuencias nucleótidas que son complementarias a las secuencias que pueden hibridar en secuencias nucleótidas discutidas en la presente (incluso secuencias complementarias de aquellas discutidas en la presente).

También se incluye en el alcance de la presente invención el uso de secuencias polinucleótidas que son capaces de hibridar en secuencias nucleótidas discutidas en la presente en condiciones de rigurosidad intermedia o máxima.

- 50 En un aspecto preferido, la presente invención cubre el uso de secuencias nucleótidas que pueden hibridar en secuencias nucleótidas discutidas en la presente, o su complemento, en condiciones de rigurosidad (por ejemplo,  $50^\circ\text{C}$  y  $0,2\times\text{SSC}$ ).

En un aspecto más preferido, la presente invención cubre el uso de secuencias nucleótidas que pueden hibridar en secuencias nucleótidas discutidas en la presente, o su complemento, en condiciones de rigurosidad alta (por ejemplo,

65°C y 0,1xSSC).

#### Expresión de polipéptidos

5 Una secuencia nucleótida para uso en la presente invención o para codificación de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente se pueden incluir en un vector replicable recombinante. El vector se puede utilizar para replicar y expresar la secuencia nucleótida, en forma polipéptida, en y/o de una célula huésped compatible. La expresión se puede controlar utilizando secuencias de control que incluyen promotores/mejoradores y otras señales de regulación de la expresión. Se pueden utilizar los promotores procariotas y los promotores funcionales en células eucariotas. Se pueden utilizar promotores específicos de tejido o específicos de estímulo. También se pueden utilizar los promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes anteriormente descritos.

10 El polipéptido producido por una célula recombinante huésped por expresión de la secuencia nucleótida se puede secretar o se puede contener intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector utilizado. Las secuencias codificantes se pueden diseñar con secuencias de señal que dirigen la secreción de las secuencias codificadoras de sustancia a través de una membrana celular procariota o eucariota.

#### 15 Constructos

El término «constructo» - que es sinónimo de términos como «conjugado», «casete» e «híbrido» - incluye una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente para uso de conformidad con la presente invención directa o indirectamente adjuntada a un promotor. Un ejemplo de una unión indirecta es la provisión de un grupo espaciador adecuado como una secuencia de intrón como el intrón Sh1 o el intrón ADH, intermedio del promotor y la secuencia nucleótida de la presente invención. Lo mismo aplica para el término «fusionado» en relación con la presente invención que incluye unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no cubren la combinación natural de la secuencia nucleótida que codifica la proteína comúnmente asociada con el promotor genético natural y cuando ambos están en su entorno natural.

El constructo puede incluso contener o expresar un marcado que permite la selección del constructo genético.

25 Para algunas aplicaciones, el constructo comprende, preferentemente, al menos una secuencia nucleótida de la presente invención o una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente unido funcionalmente al promotor.

#### Organismo

30 El término «organismo» en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que puede comprender una secuencia nucleótida de conformidad con la presente invención o una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente y/o los productos obtenidos de él.

35 El término «organismo transgénico» en relación con la presente invención incluye un organismo que comprende una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente y/o los productos obtenidos de él, y/o donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente en el organismo. Preferentemente, la secuencia nucleótida se incorpora en el genoma del organismo.

El término «organismo transgénico» no cubre las secuencias nucleótidas que codifican un nucleótido nativo en su entorno natural cuando están bajo el control de su promotor nativo, el cual también está en su entorno natural.

40 Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende uno de, o combinaciones, de una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente, constructos como se define en la presente, vectores como se define en la presente, plásmidos como se define en la presente, células como se define en la presente, o productos de estos. Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente, bajo el control de un promotor no asociado con una secuencia que codifica una lipido aciltransferasa natural.

#### Transformación de las células/organismo huésped

El organismo huésped puede ser un organismo procariota o eucariota.

Los ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen bacterias como *E. coli* y *Bacillus licheniformis*, preferentemente *B. licheniformis*.

50 Las lecciones sobre la transformación de huéspedes procarióticos están bien documentadas en la técnica, por ejemplo, ver Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se utiliza un huésped procariota, entonces la secuencia nucleótida podrá necesitar modificación antes de la transformación - como por ejemplo, mediante eliminación de intrones.

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

Las células de hongo filamentoso se pueden transformar utilizando varios procedimientos conocidos en la técnica - como un proceso que incluye la formación de protoplastos y la transformación de protoplastos seguida por la regeneración de la pared celular en una forma conocida. El uso de *Aspergillus* como un microorganismo huésped se describe en EP 0 238 023 .

5

Otro organismo huésped puede ser una planta. Se puede encontrar una revisión de las técnicas generales utilizadas para transformar plantas en artículos de Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27). Se puede encontrar más información sobre transformación vegetal en EP-A-0449375 .

10 Las lecciones generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas se presentan en las siguientes secciones.

Hongo transformado

Un organismo huésped puede ser un hongo - como por ejemplo, un hongo filamentoso. Los ejemplos de dichos huéspedes adecuados incluyen un miembro que pertenece a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

15

Las lecciones sobre la transformación de hongos filamentosos se revisan en US-A-5741665, la cual establece que las técnicas estándar para la transformación del hongo filamentoso y el cultivo del hongo son bien conocidas en la técnica. Se puede encontrar una revisión extensa de técnicas como se aplica en *N. crassa*, por ejemplo en Davis y de Serres, Methods Enzymol (1971) 17A: 79-143.

20

Se revisa más información sobre la transformación de hongos filamentosos en US-A-5674707 .

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

*Aspergillus* transgénico de conformidad con la presente invención también se puede preparar de conformidad con la información de, por ejemplo, Turner G. 1994 (Vectores para genética).

25

La expresión genética en hongo filamentoso ha sido revisada en Punt et al. (2002) Trends Biotechnol 2002 May;20(5):200-6, Archer & Peberdy Crit Rev Biotechnol (1997) 17(4):273-306.

Levadura transformada

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

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

30

En este sentido, la levadura - como las especies *Saccharomyces cerevisi* o *Pichia pastoris* (ver FEMS Microbiol Rev (2000, 24(1):45-66), se puede utilizar como un vehículo para la expresión genética heteróloga.

Se brinda una revisión de los principios de expresión genética heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de productos genéticos está dada por E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

35

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

40

Las células de levadura transformada se pueden seleccionar utilizando varios marcadores selectivos - como por ejemplo, marcadores auxotróficos, marcadores de resistencia antibiótica dominantes.

Un organismo huésped de levadura adecuado se puede seleccionar de las especies de levadura biotecnológicamente relevantes, como por ejemplo, especies de levadura seleccionadas de *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces*, *Yarrowinia* spp., *Saccharomyces* spp., que incluye *S. cerevisiae*, o *Schizosaccharomyce* spp., que incluye *Schizosaccharomyce pombe*.

45

Se puede utilizar una hebra de las especies de levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como el organismo huésped.

En una realización, el organismo huésped puede ser una especie *Hansenula*, como por ejemplo, *H. polymorpha* (como se describe en WO01/39544 ).

Plantas/células vegetales transformadas

Un organismo huésped adecuado para la presente invención puede ser una planta. Se puede encontrar una revisión de las técnicas generales en artículos de Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27) o en WO 01/16308. La planta transgénica puede producir niveles mejorados de ésteres de fitosterol y ésteres de fitostano, por ejemplo.

- 5 Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un procedimiento para la producción de una planta transgénica con niveles mejorados de ésteres de fitosterol y ésteres de fitostano, que comprenden las etapas de transformar una célula vegetal con una lípido aciltransferasa como se define en la presente (en particular, con un vector de expresión o constructo que comprende una lípido aciltransferasa como se define en la presente) y el cultivo de una planta a partir de una célula vegetal transformada.

10 Secreción

En general, se desea que el polipéptido se secrete de la célula de expresión en el medio de cultivo desde donde la enzima se puede recuperar más fácilmente. De conformidad con la presente invención, la secuencia líder de secreción se puede seleccionar sobre la base del huésped de expresión deseado. Las secuencias de señal híbridas también se pueden utilizar con el contexto de la presente invención.

- 15 Los ejemplos típicos de las secuencias líder de secreción no asociadas con una secuencia nucleótida que codifica una lípido aciltransferasa natural son aquellos que se originan del gen amiloglucosidasa fúngico (AG) (*glaA* - de las versiones de 18 y 24 aminoácidos, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen del factor a (levaduras por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen  $\alpha$ -amilasa (*Bacillus*).

Detección

- 20 En la técnica, se conoce una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácido. Los ejemplos incluyen ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

Los entendidos en la técnica conocen una amplia variedad de técnicas de etiquetado y conjugación y se pueden utilizar en varios ensayos nucleicos y de aminoácido.

- 25 Un número de empresas como por ejemplo Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), y US Biochemical Corp (Cleveland, OH) suministran kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

Las moléculas o etiquetas informantes adecuadas incluyen dichos radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que tratan el uso de dichas etiquetas incluyen US 3,817,837 ; US 3,850,752 ; US 3,939,350 ; US 3,996,345 ; US 4,277,437 ; US 4,275,149 y US 4,366,241 .

30

También se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes como se muestra en US-A-4,816,567 .

Proteínas de fusión

- 35 La lípido aciltransferasa para uso en la presente invención se puede producir como una proteína de fusión, por ejemplo, para ayudar en su extracción y purificación. Los ejemplos de socios de proteína de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión al ADN y/o dominios de activación transcripcional) y  $\beta$ -galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre el socio de proteína de fusión y la secuencia proteica de interés para permitir la remoción de las secuencias de proteína de fusión. Preferentemente, la proteína de fusión no obstaculizará la actividad de la secuencia proteica.

- 40 Los sistemas de expresión de fusión del gen en E.coli han sido revisados en Curr. Opin. Biotechnol. (1995) 6(5):501-6.

La secuencia de aminoácido de un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente se pueden ligar a una secuencia no nativa para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para analizar las genotecas de péptidos para agentes capaces de afectar la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que expresa un epítipo no nativo que se reconoce mediante un anticuerpo comercialmente disponible.

45

A continuación, la invención se describirá a modo de ejemplo únicamente, con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

- 50 La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa madura de *Aeromonas salmonicida* mutante (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (notoriamente, el aminoácido 80 está en la secuencia madura) (SEQ ID 16);

La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 1) de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965);

- La figura 3 muestra una secuencia de consenso pfam00657 de la versión de base de datos 6 (SEQ ID No. 2);
- La Figura 4 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 3), obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI: 121051);
- 5 La Figura 5 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 4) obtenida de *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017);
- La Figura 6 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 5), obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso Genbank NP\_631558);
- La Figura 7 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 6), obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso Genbank: CAC42140);
- 10 La Figura 8 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 7), obtenida del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso Genbank P41734);
- La Figura 9 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 8), obtenida del organismo *Ralstonia* (número de acceso Genbank: AL646052);
- 15 La Figura 10 muestra SEQ ID No. 9. Scoe1 NCBI código de acceso a la proteína CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 11 muestra un aminoácido que aparece como SEQ ID No. 10. Scoe2 NCBI código de acceso a la proteína CAC01477.1 GI:9716139 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 12 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 11) Scoe3 NCBI código de acceso de la proteína CAB88833.1 GI:7635996 proteína putativa secretada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 20 La Figura 13 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 12) Scoe4 NCBI código de acceso de la proteína CAB89450.1 GI:7672261 proteína putativa secretada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 14 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 13) Scoe5 NCBI código de acceso de la proteína CAB62724.1 GI:6562793 lipoproteína putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 25 La Figura 15 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 14) Srim1 NCBI código de acceso de la proteína AAK84028.1 GI:15082088 GDSL-lipasa [*Streptomyces rimosus*];
- La Figura 16 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 15) de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC#14174);
- La Figura 17 muestra SEQ ID No. 19. Scoe1 NCBI código de acceso de la proteína CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 30 La Figura 18 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 25) del constructo de fusión utilizado para la mutagénesis del gen de lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila*. Los aminoácidos resaltados son un péptido señal de xilanasasa;
- La Figura 19 muestra una secuencia de polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces* (SEQ ID No. 26);
- 35 La Figura 20 muestra una secuencia de polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (SEQ ID No. 27);
- La Figura 21 muestra una secuencia de polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (SEQ ID No. 28);
- 40 La Figura 22 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Corynebacterium efficiens* aminoácido GDSx 300 (SEQ ID No. 29);
- La Figura 23 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Novosphingobium aromaticivorans* aminoácido GDSx 284 (SEQ ID No. 30);
- La Figura 24 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces coelicolor* aa GDSx 269 (SEQ ID No. 31);
- 45 La Figura 25 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces avermitilis* aminoácido GDSx 269 (SEQ ID No. 32);
- La Figura 26 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces* (SEQ ID No. 33);

- La Figura 27 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 34) obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051) (notablemente, esta es la secuencia madura);
- La Figura 28 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 35) de la lípido aciltransferasa *Aeromonas salmonicida* madura (GCAT) (notoriamente, esta es la secuencia madura);
- 5 La Figura 29 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 36) de *Streptomyces thermosacchari*;
- La Figura 30 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 37), obtenida de *Streptomyces thermosacchari*;
- La Figura 31 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 38), obtenida de *Thermobifida fusca*/aminoácido GDSx 548;
- La Figura 32 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 39) de *Thermobifida fusca*;
- 10 La Figura 33 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 40), obtenida de *Thermobifida fusca*/GDSx;
- La Figura 34 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 41), obtenida de *Corynebacterium efficiens*/aminoácido GDSx 300;
- La Figura 35 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 42) de *Corynebacterium efficiens*;
- La Figura 36 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 43), obtenida de *S. coelicolor*/aminoácido GDSx 268;
- 15 La Figura 37 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 44) de *S. coelicolor*;
- La Figura 38 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 45), obtenida de *S. avermitilis*;
- La Figura 39 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 46) de *S. avermitilis*;
- La Figura 40 muestra una secuencia de aminoácido (SEQ ID No. 47), de *Thermobifida fusca*/GDSx;
- 20 La Figura 41 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 48) de *Thermobifida fusca*/GDSx;
- La Figura 42 muestra una alineación de L131 y homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* ilustra que la conservación del motivo GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), la casilla GANDY, que es GGND A o GGNDL, y el bloque HPT (considerado la histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados se destacan;
- La Figura 43 muestra SEQ ID No. 17 que es la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;
- 25 La Figura 44 muestra SEQ ID No. 18 que es la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;
- La Figura 45 muestra una representación de la estructura de cristal 1IVN.PDB que tiene al glicerol en el sitio activo. La Figura se desarrolló utilizando el visor Deep View Swiss-PDB;
- 30 La Figura 46 muestra la estructura de cristal 1IVN.PDB - vista lateral utilizando el visor Deep View Swiss-PDB, con glicerol en sitio activo- los residuos en 10Å del glicerol en sitio activo son de color negro;
- La Figura 47 muestra la estructura de cristal 1IVN.PDB - vista superior utilizando el visor Deep View Swiss-PDB, con glicerol en el sitio activo - los residuos en 10Å del glicerol en sitio activo son de color negro;
- La Figura 48 muestra alineación 1;
- 35 La Figura 49 muestra alineación 2;
- Las Figuras 50 y 51 muestran una alineación de 1IVN en P10480 (P10480 es la secuencia de base de datos para la enzima *A. hydrophila*), esta alineación se obtuvo de la base de datos PFAM y se utilizó en el proceso de construcción del modelo; y
- La Figura 52 muestra una alineación donde P10480 es la secuencia de base de datos para *Aeromonas hydrophila*. Esta secuencia se utiliza para la construcción del modelo y la selección del sitio (nótese que se describe la proteína completa (SEQ ID No. 25), la proteína madura (equivalente a SEQ ID No. 34) comienza en el residuo 19. A. sal es *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 4) lipasa GDSX, A. hyd es *Aeromonas hydrophila* (SEQ ID No. 34) lipasa GDSX; la secuencia de consenso contiene un \* en la posición de una diferencia entre las secuencias enumeradas);
- La Figura 53 muestra un constructo de gen utilizado en el Ejemplo 1;
- 45 La Figura 54 muestra un constructo de gen optimizado con codón (no. 052907) utilizado en el Ejemplo 1; y

- La Figura 55 muestra la secuencia del inserto XhoI que contiene el gen precursor LAT-KLM3', se destacan las casillas -35 y -10;
- La Figura 56 muestra BML780-KLM3'CAP50 (que comprende SEQ ID No. 16 - colonia superior) y BML780 (la hebra huésped vacía - colonia inferior) después de un cultivo de 48 horas a 37°C en un 1% de agar tributirina;
- 5 La Figura 57 muestra una secuencia nucleótida de *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 49) que incluye la secuencia señal (preLAT - posiciones 1 a 87);
- La Figura 58 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 50) que codifica una lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila*;
- 10 La Figura 59 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 51) que codifica una lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención obtenida del organismo *Aeromonas salmonicida*;
- La Figura 60 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 52) que codifica una lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso Genbank NC\_003888.1:8327480..8328367);
- 15 La Figura 61 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 53) que codifica una lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso Genbank AL939131.1:265480..266367);
- La Figura 62 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 54) que codifica una lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención obtenida del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso Genbank Z75034);
- 20 La Figura 63 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 55) que codifica una lípido aciltransferasa de conformidad con la presente invención obtenida del organismo *Ralstonia*;
- La Figura 64 muestra una secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 56 que codifica NCBI, código de acceso de proteína CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 25 La Figura 65 muestra una secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 57 que codifica Scoe2 código de acceso de la proteína NCBI CAC01477.1 GI:9716139 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 66 muestra una secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 58 que codifica Scoe3 código de acceso de la proteína NCBI CAB88833.1 GI:7635996 proteína secretada putativa. [*Streptomyces coelicolor*A3(2)];
- 30 La Figura 67 muestra una secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 59 que codifica Scoe4 código de acceso de la proteína NCBI CAB89450.1 GI:7672261 proteína secretada putativa. [*Streptomyces coelicolor*A3(2)];
- La Figura 68 muestra una secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 60 que codifica Scoe5 código de acceso de la proteína NCBI CAB62724.1 GI:6562793 lipoproteína putativa [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 69 muestra una secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 61 que codifica Srim1 código de acceso de la proteína NCBI AAK84028.1 GI:15082088 lipasa GDSL [*Streptomyces rimosus*];
- 35 La Figura 70 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 62) que codifica una lípido aciltransferasa *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965);
- La Figura 71 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 63) que codifica una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC#14174);
- 40 La Figura 72 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 24) que codifica una enzima de *Aeromonas hydrophila* que incluye un péptido señal de xilanasas;
- La Figura 73 muestra la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa madura de *Aeromonas salmonicida* mutante (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (notoriamente, el aminoácido 80 está en la secuencia madura) - que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 - y después de someterse a modificación post-translacional como SEQ ID No. 68 - los residuos de aminoácido 235 y 236 de la SEQ ID No. 68 no están unidos de manera covalente tras la modificación post-translacional. Los dos péptidos formados se mantienen juntos por uno o más uniones S-S. El aminoácido 236 en SEQ ID No. 68 se corresponde con el número de residuo de aminoácido 274 en SEQ ID No. 16 que se muestra en la presente;
- 45 La Figura 74 muestra leche en polvo producida de leche entera estándar, no tratada;
- 50 La Figura 75 muestra leche en polvo producida de leche entera estándar tratada con una solución de la enzima KLM3, (KTP08015, 1300 TIU/g de leche, que corresponde a 12,4 mg enzima/g de leche); la actividad de la enzima en las

unidades TIPU se miden como se describe a continuación;

La Figura 76 ilustra el aparato utilizado para realizar la prueba de humedad del Ejemplo 3;

La Figura 77 muestra una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 120), la cual codifica una lípido aciltransferasa de *A. salmonicida*;

5 La Figura 78 muestra la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa madura de *Aeromonas salmonicida* mutante (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (notoriamente, el aminoácido 80 está en la secuencia madura) - que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 - y después de someterse a modificación post-translacional como SEQ ID No. 121 - los residuos de aminoácido 235 y 236 de la SEQ ID No. 121 no están unidos de manera covalente tras la modificación post-translacional; los dos péptidos formados se mantienen juntos mediante una o más uniones S-S; el aminoácido 236 en SEQ ID No. 121 se corresponde con el número de residuo de aminoácido 275 en SEQ ID No. 16 que se muestra en la presente;

15 La Figura 79 muestra la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa madura de *Aeromonas salmonicida* mutante (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (notoriamente, el aminoácido 80 está en la secuencia madura) - que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 - y después de someterse a modificación post-translacional como SEQ ID No. 122 - los residuos de aminoácido 235 y 236 de la SEQ ID No. 122 no están unidos de manera covalente tras la modificación post-translacional; los dos péptidos formados se mantienen juntos mediante una o más uniones S-S; el aminoácido 236 en SEQ ID No. 122 se corresponde con el número de residuo de aminoácido 276 en SEQ ID No. 16 que se muestra en la presente; y

20 La Figura 80 muestra la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa madura de *Aeromonas salmonicida* mutante (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (notoriamente, el aminoácido 80 está en la secuencia madura) - que se muestra en la presente como SEQ ID No. 16 - y después de someterse a modificación post-translacional como SEQ ID No. 123 - los residuos de aminoácido 235 y 236 de la SEQ ID No. 123 no están unidos de manera covalente tras la modificación post-translacional; los dos péptidos formados se mantienen juntos mediante una o más uniones S-S; el aminoácido 236 en SEQ ID No. 123 se corresponde con el número de residuo de aminoácido 277 en SEQ ID No. 16 que se muestra en la presente.

Determinación de la actividad fosfolipasa (Ensayo TIPU-K):

Sustrato:

Se disolvieron un 0,6% de L- $\alpha$  fosfatidilcolina, un 95% vegetal (Avanti #441601), un 0,4% de Triton-X 100 (Sigma X-100), y 5 mM CaCl<sub>2</sub> en 0,05M de tampón de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), pH 7.

30 Procedimiento del ensayo:

Se agregaron 34  $\mu$ l de sustrato en una cubeta, utilizando el analizador automático KoneLab. Al tiempo T= 0 min, se agregaron 4 $\mu$ l de solución enzimática. Asimismo, se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló e incubó a 30°C durante 10 minutos.

El contenido de ácido graso libre de la muestra se analizó utilizando el kit NEFA C de WAKO GmbH.

35 La actividad enzimática TIPO, pH 7, se calculó como ácido graso en micromoles producido por minuto en condiciones de ensayo.

Ejemplo 1: Expresión de KLM3' en *Bacillus licheniformis*

40 Se expresó una secuencia nucleótida (SEQ ID No. 49) que codifica una lípido aciltransferasa (SEQ. ID No. 16, en adelante KLM3') en *Bacillus licheniformis* como una proteína de fusión con el péptido señal de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (LAT) (ver Figuras. 53 y 54). Para la expresión óptima en *Bacillus*, se ordenó un constructo de gen optimizado con codón (no. 052907) en Geneart (Geneart AG, Regensburg, Alemania).

45 El constructo no. 052907 contiene un promotor LAT incompleto (solo la secuencia -10) en frente del gen precursor LAT-KLM3' y la transcripción LAT (Tlat) hacia abajo del gen precursor LAT-KLM3' (ver las Figuras 53 y 55). Para crear un fragmento de *Xho*I que contiene el gen precursor LAT-KLM3' flanqueado por el promotor LAT completo en el extremo 5' y el terminador LAT en el extremo 3', se realizó una ampliación de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con los cebadores Plat5XhoI\_FW y EBS2XhoI\_RV y el constructo del gen 052907 como modelo.

Plat5XhoI\_FW:

ccccgctcgaggcttttcttttgaagaaaatatagggaaaatggtactgttaaaaattc  
ggaatattatacaatatcatatgtttcacattgaaagggg

EBS2XhoI\_RV: tggaatctcgaggtttatcctttacctgtctcc

- 5 Se realizó PCR en un termociclador con ADN polimerasa de alta fidelidad de fusión (Finnzymes OY, Espoo, Finlandia) de conformidad con las instrucciones del fabricante (temperatura de recocido de 55°C).

El fragmento de PCR resultante se digirió con enzima de restricción *XhoI* y ligó con ADN ligasa T4 en pCatH digerida con *XhoI*, de conformidad con las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

- 10 La mezcla de ligado se transformó en hebra de *B. subtilis* SC6.1 como se describe en US 2002-0182734 ( WO 02/14490 ). La secuencia del inserto *XhoI* que contiene el gen precursor LAT-KLM3' fue confirmada por la secuenciación del ADN (BaseClear, Leiden, Países Bajos) y uno de los clones de plásmido correctos se designó pCatH-KLM3'(ori1) (Figura 53). pCatH-KLM3'(ori1) se transformó en la cepa BML780 de *B. licheniformis* (un derivado de BRA7 y BML612, ver WO2005111203 ) a la temperatura permitida (37°C).

- 15 Se seleccionó un transformante resistente a la neomicina (neoR) y resistente a cloranfenicol (CmR) y se designó como BML780(pCatH-KLM3'(ori1)). El plásmido en BML780(pCatH-KLM3'(ori1)) se integró en la región catH en el genoma *B. licheniformis* mediante el cultivo de la cepa a una temperatura no permitida (50°C) en un medio con 5 µg/ml de cloranfenicol. Se seleccionó un clon resistente a CmR y se designó como BML780-pCatH-KLM3'(ori1). BML780-pCatH- KLM3'(ori1) se cultivó nuevamente a una temperatura permitida durante varias generaciones sin antibióticos para sacar las secuencias de vector y posteriormente se seleccionó un clon CmR sensible a neomicina (neoS). En este clon, las secuencias de vector de pCatH en el cromosoma se escinden (incluso el gen de resistencia a la neomicina) y solo se deja el casete de catH - LATKLM3'. Posteriormente, el casete de catH - LATKLM3' en el cromosoma se amplía mediante el cultivo de la cepa en un medio con concentraciones crecientes de cloranfenicol. Después de varias rondas de ampliación, se seleccionó un clon (resistente a 50 µg/ml de cloranfenicol) y se designó como BML780-KLM3'CAP50. Para verificar la expresión KLM3', se cultivaron BML780-KLM3'CAP50 y BML780 (la cepa huésped vacía) durante 48 horas a 37°C en una placa de agar Heart Infusion (Bacto) con un 1% de tributirina. Se visualizó claramente una zona de limpieza, indicadora de actividad lípido aciltransferasa, alrededor de la colonia de BML780-KLM3'CAP50 pero no alrededor de la cepa huésped BML780 (ver Figura 56). Este resultado muestra que se expresó una cantidad sustancial de KLM3' en la cepa BML780-KLM3'CAP50 de *B. licheniformis* y que estas moléculas KLM3' son funcionales.

- 30 Ejemplo comparativo 1

Construceto vector

El construceto plásmido es pCS32new N80D, el cual es un derivado de pCCmini que lleva la secuencia que codifica la forma madura de la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa nativa de *Aeromonas salmonicida* con una sustitución Asn en Asp en la posición 80 (KLM3'), bajo el control del promotor p32 y con una secuencia de señal CGTasa.

- 35 La cepa huésped utilizada para la expresión se encuentra en la cepa OS21ΔAprE de *Bacillus subtilis*.

El nivel de expresión se mide como actividad transferasa, expresada como un % del colesterol esterificado, calculado de la diferencia en el colesterol libre en la muestra de referencia y colesterol libre en la muestra enzimática en reacciones con PC (T<sub>PC</sub>) como donador y colesterol como molécula aceptadora.

Condiciones del cultivo

- 40 Se inocularon 5 ml de suspensión de LB (digerido enzimático de caseína, 10 g/l; extracto de levadura baja en sodio, 5 g/l; cloruro de sodio, 5 g/l; colaboradores de compresión inertes, 2 g/l) complementados con 50 mg/l de canamicina, con una única colonia y se incubaron a 30°C durante 6 horas a 205 rpm. Se utilizaron 0,7 ml de este cultivo para inocular 50 ml de medio SAS (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 g/l; MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico), 40 g/l; cloruro de sodio, 5 g/l; antiespumante (Sin 260), 5 gotas/l; harina de soja desgrasada, 20 g/l; Biospringer 106 (100 % dw YE), 20 g/l)
- 45 complementados con 50 mg/l de canamicina y una solución de hidrolizados de almidón con alto contenido de maltosa (60 g/l). La incubación se continuó durante 40 horas a 30°C y 180 rpm antes de que el sobrenadante del cultivo se separara por centrifugación a 19000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se utilizó directamente para la medición de la actividad transferasa.

Preparación de sustratos y reacción enzimática

- 50 Se escalaron PC (lípidos Avanti Polar #441601) y colesterol (Sigma C8503) en una relación 9:1, disueltos en cloroformo y se evaporaron hasta secarse.

El sustrato se preparó mediante dispersión de un 3% PC:Colesterol 9:1 en 50 mM de tampón HEPES a pH 7.

5 Se transfirieron 0,250 ml de solución de sustrato en un tubo de vidrio de 3 ml con tapa de rosca. Se agregaron 0,025 ml de sobrenadante de cultivo y la mezcla se incubó a 40°C durante 2 horas. También se preparó una muestra de referencia con agua en lugar de enzima. El calentamiento de la mezcla de reacción en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos detuvo la reacción enzimática. Se agregaron 2 ml de un 99% de etanol a la mezcla de reacción antes de someter el colesterol a análisis de ensayo.

Ensayo de colesterol

10 Se incubaron 100 µl de sustrato que contiene 1,4 U/ml de colesterol oxidasa (SERVA Electrophoresis GmbH cat. No 17109), 0,4 mg/ml de ABTS (Sigma A-1888), 6 U/ml de peroxidasa (Sigma 6782) en 0,1 M de Tris-HCl, pH 6,6 y un 0,5 % de Triton X-100 (Sigma X-100) a 37°C durante 5 minutos antes de la incorporación de 5 µl de muestra de reacción enzimática y se mezclaron. La mezcla de reacción se incubó durante otros 5 minutos y se midió OD<sub>405</sub>. El contenido de colesterol se calculó de los análisis de las soluciones estándar de colesterol que contienen 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,20 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0 mg/ml de colesterol en un 99% de etanol.

Resultados

15 La siguiente Tabla 3 muestra el medio de 8 cultivos de expresión independientes:

Tabla 3

Cepa	T <sub>PC</sub> <sup>a</sup>
<b>OS21ΔAprE[pCS3 2new]</b>	74,2 ±10,1 <sup>b</sup>
<sup>a</sup> T <sub>PC</sub> es la actividad transferasa, expresada como un % del colesterol esterificado, calculado de la diferencia en el colesterol libre en la muestra de referencia y colesterol libre en la muestra enzimática en reacciones con PC como molécula donadora y colesterol como molécula aceptadora.	
<sup>b</sup> Medio de 8 cultivos de expresión independientes	

Ejemplo 2: Prueba de determinación enzimática

20 En los ensayos descritos a continuación, el contenido de humedad, el tiempo de humectación y el colesterol y los niveles de éster de colesterol de la leche en polvo formado por secado por pulverización de 25 litros de leche entera estándar que habían sido tratados con una enzima durante 30 minutos y 4 horas (como se describe a continuación) se compararon con leche en polvo formada mediante la incorporación de 25 litros de leche entera estándar directamente en la torre de secado por pulverización (denominada a continuación como la muestra de control).

Tratamiento enzimático de leche entera de ARLA

25 Se calentaron 20 litros de leche entera a 40°C y se agregaron 76 µl de una solución de la enzima de SEQ ID No. 16 (en adelante KLM3'), (KTP08015, 1300 TIPU/g de leche, correspondiente a 12,4 mg de enzima/g de leche).

La mezcla continuó durante 38 minutos para garantizar homogeneidad y la leche tratada se dividió posteriormente en 2 lotes. El lote 1 se bombeó en la torre de pulverización de inmediato; el lote 2 se bombeó en la torre de pulverización 4 horas después de agregar enzima.

30 Los parámetros utilizados para el funcionamiento del secador por pulverización de la planta piloto durante los ensayos fueron los siguientes:

Muestra de control (leche entera ARLA)

Torre de pulverización: Modelo NIRO DRYER P 6.3; 400 m<sup>3</sup>; entrada de aire a 220°C; potencia 54 kW.

Temperaturas de salida: 105 / 40,5°C (aire/producto).

Temperatura de alimentación 40°C. Bomba de alimentación Rannie 17 rpm.

35 Presión de la boquilla atomizadora 18 MPa (180 bar) (ata). Tipo de bombilla KMFP SKYM M76.

Lote 1 tratado con enzima

400 m<sup>3</sup>; ingreso de aire a 195°C; potencia 48 kW.

Temperaturas de salida: 100 -103 / 43°C (aire/producto).

Temperatura de alimentación 40°C. Bomba de alimentación Rannie 15 rpm.

Presión de la boquilla atomizadora 16 MPa (160 bar) (ata). Tipo de bombilla KMFP SKYM M76.

Lote 2 tratado con enzima

400 m<sup>3</sup>; ingreso de aire a 195°C; potencia 48 kW.

Temperaturas de salida: 100 -103 / 43°C (aire/producto).

5 Temperatura de alimentación 42°C. Bomba de alimentación Rannie 16 rpm.

Presión de la boquilla de atomización: 17,5 MPa (175 bar) (ata). Tipo de bombilla KMFP SKYM M76.

Ejemplo 3: Prueba de humedad

10 Las leches en polvo derivadas del Ejemplo 2 se probaron para verificar humedad de conformidad con el procedimiento IDF 87:1979 con debida consideración al hecho de que el procedimiento pretende probar las leches en polvo instantáneas, mientras que los polvos provenientes del secador de la planta piloto son polvos no instantáneos y no aglomerados. El aparato utilizado se ilustra en la Figura 76.

Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Las características del polvo muestran que el polvo hecho de leche enzimática fluye con más libertad y tiene una tendencia a aglomerarse apenas menor.

15 Tabla 4

Muestra	Tiempo de humectación
Control	> 10 minutos en las 3 pruebas repetidas
Lote 1 tratado con enzima	1ra prueba repetida 403 segundos; 2da prueba repetida 394 segundos; Tiempo de humectación medio, 399 segundos.
Lote 2 tratado con enzima	1ra prueba repetida 320 segundos; 2da prueba repetida 309 segundos; Tiempo de humectación medio, 315 segundos.

Ejemplo 4: Análisis de contenido de humedad residual en muestras de polvo después del almacenamiento

20 Las muestras preparadas de conformidad con el Ejemplo 2 anterior se analizaron para verificar el contenido de humedad residual en muestras de polvo después del almacenamiento durante una semana a 5°C utilizando un analizador de humedad ML-50 de A&D Company, Limited. Los análisis de humedad se realizaron después de secarse a 120°C hasta alcanzar un peso constante y a 140° hasta alcanzar el peso constante. Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Muestra	Temperatura de secado 120°C	Temperatura de secado 140°C	Medio, % de agua
Control	2,5	2,6	2,6
Lote 1 tratado con enzima	2,0	2,1	2,1
Lote 2 tratado con enzima	1,7	1,8	1,8

Ejemplo 5: Determinación de colesterol y niveles de éster de colesterol

25 Las muestras de leche en polvo preparadas en el Ejemplo 2 anterior se analizaron mediante GLC para verificar el contenido de colesterol y éster de colesterol. El procedimiento utilizado se describe a continuación.

Se midieron con escala 100 mg de leche en polvo en un tubo centrífugo de 15 ml con tapa. Se agregaron 5 ml de cloroformo:metanol a una relación de 2:1, y la muestra se extrajo durante 30 minutos por rotación en un RotaMix® a 40 rpm. La muestra se centrifugó. Una alícuota ajustada a escala del disolvente se transfirió a 10 ml de Dramglass y el disolvente se evaporó bajo un vapor de nitrógeno a 50°C. La muestra aislada se analizó mediante GLC.

30

## ES 2 645 041 T3

Cromatografía de gases:

Cromatógrafo de gas capilar Perkin Elmer Autosystem 9000 equipado con una columna de sílice fusionada WCOT de 12,5 m x 0,25 mm ID x 0,1 µ de espesor de película, un 5% de fenil-metilsilicona (CP Sil 8 CB de Chrompack).

Gas portador: Helio.

- 5 Inyector. Inyección partida en frío PSSI (temp. Inicial 50°C, calentada a 385°C), volumen 1,0µl.

Detector FID: 395°C

Programa del horno (utilizado desde 30.10.2003):	1	2	3
Temperatura del horno, °C.	90	280	350
Tiempo isotérmico, min.	1	0	10
Índice de temperatura, °C/min.	15	4	

Preparación de muestras de leche para análisis GC:

La fracción lipídica se volvió a disolver en heptano/piridina (2:1) que contiene heptadecano como estándar interno y el colesterol se mide mediante GC.

- 10 Una solución de muestra de 500µl se transfirió posteriormente a un vial magnético, se agregaron 100 µl de MSTFA:TMCS - 99:1 (N-Metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y se dejaron reaccionar durante 20 minutos a 60°C.

Cálculo: Los factores de respuesta para el colesterol y los ésteres de colesterol se determinan de material de referencia puro (ponderación de material puro 8-10 mg en 12 ml de piridina, que contiene heptadecano estándar interno, 0,5 mg/ml).

- 15 Los resultados se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Muestra	% de colesterol	% de éster de colesterol	% de colesterol esterificado
Control	0,084	0	0
Lote 1 tratado con enzima	0,021	0,080	69,2
Lote 2 tratado con enzima	0,007	0,094	89,0

Conclusiones

- 20 El tratamiento enzimático de la leche entera con lípido aciltransferasa KLM3 tiene un impacto importante en la humectabilidad de la leche en polvo producida de la leche. El tratamiento enzimático también tiene impacto en la temperatura de secado, dado que se muestra que las muestras tratadas con enzima tienen un contenido de agua menor que control.

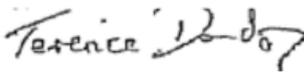
El colesterol libre en leche producida de leche tratada con aciltransferasa se redujo significativamente en comparación con un control sin tratamiento enzimático.

RECIBOS DE DEPÓSITO

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S Langebrogade 1 DK-1001 Copenhagen Dinamarca	FORMULARIO INTERNACIONAL  RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al pie de la página
--	---

NOMBRE Y DOMICILIO DEL DEPOSITANTE

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE:  Escherichia coli TOP 10 pPet12aAhydro	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41204
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en el punto I anterior estuvo acompañado de:	
<input type="checkbox"/> Una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz la opción que corresponda)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
La Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el punto I anterior, el cual recibió el 22 de diciembre de 2003 (fecha del depósito original). <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPCIÓN DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado en el punto I anterior fue recibido por la Autoridad Internacional de Depósito el (fecha del depósito original); asimismo dicha autoridad también ha recibido una solicitud de convertir el depósito original en un depósito de conformidad con el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Escocia RU	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):    Fecha: 9 de enero de 2004

En los casos en que aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha será la fecha en la que se adquirió el estado de autoridad internacional de depósito.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S  
Langebrogade 1  
DK-1001 Copenhagen  
Dinamarca

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL  
Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de la  
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO  
identificada al pie de la página

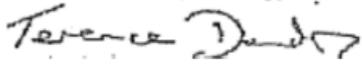
NOMBRE Y DOMICILIO DE LA PARTE A FAVOR  
DE QUIEN SE EMITE LA DECLARACIÓN DE  
VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE:	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: COMO SE DETERMINÓ ANTERIORMENTE Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NCIMB 41204 Fecha del depósito o la transferencia <sup>2</sup> : 22 de diciembre de 2003
III. VIABILIDAD DE LA DECLARACIÓN	
Se probó la viabilidad del microorganismo identificado en el punto II anterior el 22 de diciembre de 2003 <sup>2</sup> . En dicha fecha, el microorganismo era:  <input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable <input type="checkbox"/> Ya no era viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, en caso de un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

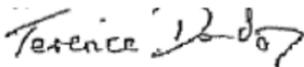
<sup>2</sup> En los casos mencionados en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), remitirse a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz la casilla que corresponda.

IV. CONDICIONES BAJO LAS QUE SE REALIZÓ EL ESTUDIO DE VIABILIDAD	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):   9 de enero de 2004

<sup>4</sup> Completar si se ha solicitado información y si los resultados de la prueba dieron negativo.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S Langebrogade 1 DK-1001 Copenhagen Dinamarca	FORMULARIO INTERNACIONAL  RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al pie de la página
NOMBRE Y DOMICILIO DEL DEPOSITANTE	
I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE:  Escherichia coli TOP 10 pPet12aAsalmo	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41205
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en el punto I anterior estuvo acompañado de:  <input type="checkbox"/> Una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz la opción que corresponda)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
La Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el punto I anterior, el cual recibió el 22 de diciembre de 2003 (fecha del depósito original). <sup>1</sup>	
IV. RECEPCIÓN DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en el punto I anterior fue recibido por la Autoridad Internacional de Depósito el (fecha del depósito original); asimismo dicha autoridad también ha recibido una solicitud de convertir el depósito original en un depósito de conformidad con el Tratado de Budapest  el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Escocia RU	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):    Fecha: 9 de enero de 2004

<sup>1</sup>En los casos en que aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha será la fecha en la que se adquirió el estado de autoridad internacional de depósito.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

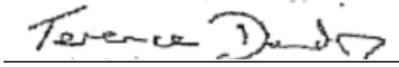
Danisco A/S Langebrogade 1 DK-1001 Copenhagen Dinamarca	FORMULARIO INTERNACIONAL  RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al pie de la página
--	---

NOMBRE Y DOMICILIO DE LA PARTE A FAVOR DE QUIEN SE EMITE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
I. DEPOSITANTE:	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre:      COMO SE DETERMINÓ ANTERIORMENTE  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NCIMB 41204  22 de diciembre de 2003
I.      VIABILIDAD DE LA DECLARACIÓN	
Se probó la viabilidad del microorganismo identificado en el punto II anterior el 22 de diciembre de 2003 <sup>2</sup> . En dicha fecha, el microorganismo era:	
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable <input type="checkbox"/> Ya no era viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, en caso de un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

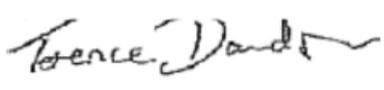
<sup>2</sup> En los casos mencionados en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), remitirse a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz la casilla que corresponda.

IV. CONDICIONES BAJO LAS QUE SE REALIZÓ EL ESTUDIO DE VIABILIDAD	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):   9 de enero de 2004

<sup>4</sup> Completar si se ha solicitado información y si los resultados de la prueba dieron negativo.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco Intellectual Assets Danisco A/S Langebrogade 1 DK-1001 Copenhagen Dinamarca	FORMULARIO INTERNACIONAL  RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al pie de la página
NOMBRE Y DOMICILIO DEL DEPOSITANTE	
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE:  cepas de <i>Streptomyces</i> L130	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41226
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en el punto I anterior estuvo acompañado de:	
<input type="checkbox"/> Una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz la opción que corresponda)	
<b>III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN</b>	
La Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el punto I anterior, el cual recibió el 23 de junio de 2004 (fecha del depósito original). <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPCIÓN DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado en el punto I anterior fue recibido por la Autoridad Internacional de Depósito el (fecha del depósito original); asimismo dicha autoridad también ha recibido una solicitud de convertir el depósito original en un depósito de conformidad con el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Escocia RU	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):    Fecha: 28 de junio de 2004

<sup>1</sup>En los casos en que aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha será la fecha en la que se adquirió el estado de autoridad internacional de depósito.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

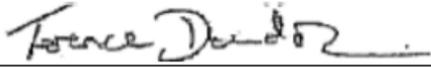
Danisco Intellectual Assets Danisco A/S Langebrogade 1 DK-1001 Copenhagen Dinamarca	FORMULARIO INTERNACIONAL  RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al pie de la página
---	---

NOMBRE Y DOMICILIO DE LA PARTE A FAVOR DE QUIEN SE EMITE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
I. DEPOSITANTE:	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: COMO SE DETERMINÓ ANTERIORMENTE  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NCIMB 41226 Fecha del depósito o la transferencia:  23 de junio de 2004
III. VIABILIDAD DE LA DECLARACIÓN	
Se probó la viabilidad del microorganismo identificado en el punto II anterior el 25 de junio de 2004 <sup>2</sup> . En dicha fecha, el microorganismo era:	
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable  <input type="checkbox"/> Ya no era viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, en caso de un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos mencionados en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), remitirse a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz la casilla que corresponda.

IV. CONDICIONES BAJO LAS QUE SE REALIZÓ EL ESTUDIO DE VIABILIDAD	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):   28 de junio de 2004

<sup>4</sup> Completar si se ha solicitado información y si los resultados de la prueba dieron negativo.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco Intellectual Assets Danisco A/S Langebrogade 1 DK-1001 Copenhagen Dinamarca	FORMULARIO INTERNACIONAL  RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL Emitido de conformidad con la Regla 7.1 de la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al pie de la página
NOMBRE Y DOMICILIO DEL DEPOSITANTE	
I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE:  cepas de <i>Streptomyces</i> L130	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41227
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en el punto I anterior estuvo acompañado de:	
<input type="checkbox"/> Una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz la opción que corresponda)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
La Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el punto I anterior, el cual recibió el 23 de junio de 2004 (fecha del depósito original). <sup>1</sup>	
IV. RECEPCIÓN DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en el punto I anterior fue recibido por la Autoridad Internacional de Depósito el (fecha del depósito original); asimismo dicha autoridad también ha recibido una solicitud de convertir el depósito original en un depósito de conformidad con el Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Escocia RU	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):    Fecha: 28 de junio de 2004

<sup>1</sup>En los casos en que aplica la Regla 6.4(d), dicha fecha será la fecha en la que se adquirió el estado de autoridad internacional de depósito.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO  
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS  
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco Intellectual Assets Danisco A/S Langebrogade 1 DK-1001 Copenhague Dinamarca	FORMULARIO INTERNACIONAL  RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL Emitido de conformidad con la Regla 10.2 de la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada en la siguiente página
---	---

NOMBRE Y DOMICILIO DE LA PARTE A FAVOR DE QUIEN SE EMITE LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
I. DEPOSITANTE:	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: COMO SE DETERMINÓ ANTERIORMENTE  Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: NCIMB 41227 Fecha del depósito o la transferencia:  23 de junio de 2003
VI. VIABILIDAD DE LA DECLARACIÓN	
Se probó la viabilidad del microorganismo identificado en el punto II anterior el 25 de junio de 2004 <sup>2</sup> . En dicha fecha, el microorganismo era:	
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable	
<input type="checkbox"/> Ya no era viable	

<sup>1</sup> Indicar la fecha del depósito original o, en caso de un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

<sup>2</sup> En los casos mencionados en la Regla 10.2(a)(ii) y (iii), remitirse a la prueba de viabilidad más reciente.

<sup>3</sup> Marcar con una cruz la casilla que corresponda.

VI. CONDICIONES BAJO LAS QUE SE REALIZÓ EL ESTUDIO DE VIABILIDAD	
VII. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Domicilio: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de lo(s) funcionario(s) autorizado(s):   28 de junio de 2004

<sup>4</sup> Completar si se ha solicitado información y si los resultados de la prueba dieron negativo.

Formulario BP/9 (segunda y última página)

**Listado de secuencias**

- <110> DANISCO A/S
- <120> Método
- 5 <130> P038564WO
- <150> GB 0920089.0
- <151> 17-11-2009
- <150> US 61/262285
- <151> 18-11-2009
- 10 <160> 124

ES 2 645 041 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 1

```

Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Val Ala Leu Thr Val
1          5          10          15

Gln Ala Ala Asp Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly
          20          25          30

Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr
          35          40          45

Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro
          50          55          60

Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala
65          70          75          80

Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser
          85          90          95

Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr
          100          105          110

Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu
          115          120          125

Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln
          130          135          140

Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met
145          150          155          160

```

ES 2 645 041 T3

Val Leu Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu  
 165 170 175

Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser  
 180 185 190

His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln  
 195 200 205

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

Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu  
 225 230 235 240

Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg  
 245 250 255

Ser Val Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg  
 260 265 270

Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro  
 275 280 285

Met Ala Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe  
 290 295 300

Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu  
 305 310 315 320

Arg Ala Ala Thr Phe Ile Ala Asn Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His  
 325 330 335

<210> 2

<211> 361

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de consenso Pfam00657

<400> 2

Ile Val Ala Phe Gly Asp Ser Leu Thr Asp Gly Glu Ala Tyr Tyr Gly  
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly Gly Gly Trp Gly Ala Gly Leu Ala Asp Arg Leu Thr  
 20 25 30

Ala Leu Leu Arg Leu Arg Ala Arg Pro Arg Gly Val Asp Val Phe Asn  
 35 40 45

ES 2 645 041 T3

Arg Gly Ile Ser Gly Arg Thr Ser Asp Gly Arg Leu Ile Val Asp Ala  
50 55 60

Leu Val Ala Leu Leu Phe Leu Ala Gln Ser Leu Gly Leu Pro Asn Leu  
65 70 75 80

Pro Pro Tyr Leu Ser Gly Asp Phe Leu Arg Gly Ala Asn Phe Ala Ser  
85 90 95

Ala Gly Ala Thr Ile Leu Pro Thr Ser Gly Pro Phe Leu Ile Gln Val  
100 105 110

Gln Phe Lys Asp Phe Lys Ser Gln Val Leu Glu Leu Arg Gln Ala Leu  
115 120 125

Gly Leu Leu Gln Glu Leu Leu Arg Leu Leu Pro Val Leu Asp Ala Lys  
130 135 140

Ser Pro Asp Leu Val Thr Ile Met Ile Gly Thr Asn Asp Leu Ile Thr  
145 150 155 160

Ser Ala Phe Phe Gly Pro Lys Ser Thr Glu Ser Asp Arg Asn Val Ser  
165 170 175

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

Ser Asn Asn Gly Ala Arg Ile Ile Val Leu Ile Thr Leu Val Ile Leu  
195 200 205

Asn Leu Gly Pro Leu Gly Cys Leu Pro Leu Lys Leu Ala Leu Ala Leu  
210 215 220

Ala Ser Ser Lys Asn Val Asp Ala Ser Gly Cys Leu Glu Arg Leu Asn  
225 230 235 240

Glu Ala Val Ala Asp Phe Asn Glu Ala Leu Arg Glu Leu Ala Ile Ser  
245 250 255

Lys Leu Glu Asp Gln Leu Arg Lys Asp Gly Leu Pro Asp Val Lys Gly  
260 265 270

Ala Asp Val Pro Tyr Val Asp Leu Tyr Ser Ile Phe Gln Asp Leu Asp  
275 280 285

Gly Ile Gln Asn Pro Ser Ala Tyr Val Tyr Gly Phe Glu Thr Thr Lys  
290 295 300

ES 2 645 041 T3

Ala Cys Cys Gly Tyr Gly Gly Arg Tyr Asn Tyr Asn Arg Val Cys Gly  
305 310 315 320

Asn Ala Gly Leu Cys Asn Val Thr Ala Lys Ala Cys Asn Pro Ser Ser  
325 330 335

Tyr Leu Leu Ser Phe Leu Phe Trp Asp Gly Phe His Pro Ser Glu Lys  
340 345 350

Gly Tyr Lys Ala Val Ala Glu Ala Leu  
355 360

<210> 3

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 3

Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Val Ala Leu Thr Val  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Asp Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly  
20 25 30

Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr  
35 40 45

Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro  
50 55 60

Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Asn Glu Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala  
65 70 75 80

Asn Glu Ala Glu Gly Gly Pro Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser  
85 90 95

Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr  
100 105 110

Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu  
115 120 125

Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln  
130 135 140

Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met  
145 150 155 160

Val Leu Asn Gly Ala Lys Glu Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu  
165 170 175

ES 2 645 041 T3

Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Ala Ser  
 180 185 190

His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln  
 195 200 205

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

Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Gln Arg  
 225 230 235 240

Asn Ala Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Ser Arg  
 245 250 255

Ser Ala Ser Thr Asp Ser Gln Leu Ser Ala Phe Asn Pro Gln Glu Arg  
 260 265 270

Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro  
 275 280 285

Met Ala Ala Arg Ser Ala Ser Thr Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe  
 290 295 300

Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu  
 305 310 315 320

Pro Ala Ala Thr Phe Ile Glu Ser Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His  
 325 330 335

<210> 4

<211> 336

<212> PRT

5 <213> Aeromonas salmonicida

<400> 4

Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Ile Ala Leu Thr Val  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly  
 20 25 30

Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr  
 35 40 45

Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro  
 50 55 60

ES 2 645 041 T3

Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala  
65 70 75 80

Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser  
85 90 95

Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr  
100 105 110

Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu  
115 120 125

Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln  
130 135 140

Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met  
145 150 155 160

Val Leu Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu  
165 170 175

Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser  
180 185 190

His Val Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln  
195 200 205

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

Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu  
225 230 235 240

Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg  
245 250 255

Ser Val Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg  
260 265 270

Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro  
275 280 285

Met Ala Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe  
290 295 300

Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu  
305 310 315 320

Arg Ala Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly

ES 2 645 041 T3

325 330 335

<210> 5  
 <211> 295  
 <212> PRT  
 5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 5

Met Pro Lys Pro Ala Leu Arg Arg Val Met Thr Ala Thr Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Val Gly Thr Leu Ala Leu Gly Leu Thr Asp Ala Thr Ala His Ala Ala  
 20 25 30

Pro Ala Gln Ala Thr Pro Thr Leu Asp Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Gly Ser Gly Val Leu Pro Val Asp Pro Ala Asn Leu Leu  
 50 55 60

Cys Leu Arg Ser Thr Ala Asn Tyr Pro His Val Ile Ala Asp Thr Thr  
 65 70 75 80

Gly Ala Arg Leu Thr Asp Val Thr Cys Gly Ala Ala Gln Thr Ala Asp  
 85 90 95

Phe Thr Arg Ala Gln Tyr Pro Gly Val Ala Pro Gln Leu Asp Ala Leu  
 100 105 110

Gly Thr Gly Thr Asp Leu Val Thr Leu Thr Ile Gly Gly Asn Asp Asn  
 115 120 125

Ser Thr Phe Ile Asn Ala Ile Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly Val Leu  
 130 135 140

Ser Gly Gly Lys Gly Ser Pro Cys Lys Asp Arg His Gly Thr Ser Phe  
 145 150 155 160

Asp Asp Glu Ile Glu Ala Asn Thr Tyr Pro Ala Leu Lys Glu Ala Leu  
 165 170 175

Leu Gly Val Arg Ala Arg Ala Pro His Ala Arg Val Ala Ala Leu Gly  
 180 185 190

Tyr Pro Trp Ile Thr Pro Ala Thr Ala Asp Pro Ser Cys Phe Leu Lys  
 195 200 205

Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp Val Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Gln Ala  
 210 215 220

ES 2 645 041 T3

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

Tyr Val Asp Phe Ser Gly Val Ser Asp Gly His Asp Ala Cys Glu Ala  
245 250 255

Pro Gly Thr Arg Trp Ile Glu Pro Leu Leu Phe Gly His Ser Leu Val  
260 265 270

Pro Val His Pro Asn Ala Leu Gly Glu Arg Arg Met Ala Glu His Thr  
275 280 285

Met Asp Val Leu Gly Leu Asp  
290 295

<210> 6

<211> 295

<212> PRT

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 6

Met Pro Lys Pro Ala Leu Arg Arg Val Met Thr Ala Thr Val Ala Ala  
1 5 10 15

Val Gly Thr Leu Ala Leu Gly Leu Thr Asp Ala Thr Ala His Ala Ala  
20 25 30

Pro Ala Gln Ala Thr Pro Thr Leu Asp Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser  
35 40 45

Tyr Ser Ala Gly Ser Gly Val Leu Pro Val Asp Pro Ala Asn Leu Leu  
50 55 60

Cys Leu Arg Ser Thr Ala Asn Tyr Pro His Val Ile Ala Asp Thr Thr  
65 70 75 80

Gly Ala Arg Leu Thr Asp Val Thr Cys Gly Ala Ala Gln Thr Ala Asp  
85 90 95

Phe Thr Arg Ala Gln Tyr Pro Gly Val Ala Pro Gln Leu Asp Ala Leu  
100 105 110

Gly Thr Gly Thr Asp Leu Val Thr Leu Thr Ile Gly Gly Asn Asp Asn  
115 120 125

Ser Thr Phe Ile Asn Ala Ile Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly Val Leu  
130 135 140

Ser Gly Gly Lys Gly Ser Pro Cys Lys Asp Arg His Gly Thr Ser Phe

ES 2 645 041 T3

145 150 155 160

Asp Asp Glu Ile Glu Ala Asn Thr Tyr Pro Ala Leu Lys Glu Ala Leu  
165 170 175

Leu Gly Val Arg Ala Arg Ala Pro His Ala Arg Val Ala Ala Leu Gly  
180 185 190

Tyr Pro Trp Ile Thr Pro Ala Thr Ala Asp Pro Ser Cys Phe Leu Lys  
195 200 205

Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp Val Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Gln Ala  
210 215 220

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

Tyr Val Asp Phe Ser Gly Val Ser Asp Gly His Asp Ala Cys Glu Ala  
245 250 255

Pro Gly Thr Arg Trp Ile Glu Pro Leu Leu Phe Gly His Ser Leu Val  
260 265 270

Pro Val His Pro Asn Ala Leu Gly Glu Arg Arg Met Ala Glu His Thr  
275 280 285

Met Asp Val Leu Gly Leu Asp  
290 295

<210> 7

<211> 238

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

Met Asp Tyr Glu Lys Phe Leu Leu Phe Gly Asp Ser Ile Thr Glu Phe  
1 5 10 15

Ala Phe Asn Thr Arg Pro Ile Glu Asp Gly Lys Asp Gln Tyr Ala Leu  
20 25 30

Gly Ala Ala Leu Val Asn Glu Tyr Thr Arg Lys Met Asp Ile Leu Gln  
35 40 45

Arg Gly Phe Lys Gly Tyr Thr Ser Arg Trp Ala Leu Lys Ile Leu Pro  
50 55 60

Glu Ile Leu Lys His Glu Ser Asn Ile Val Met Ala Thr Ile Phe Leu  
65 70 75 80

ES 2 645 041 T3

Gly Ala Asn Asp Ala Cys Ser Ala Gly Pro Gln Ser Val Pro Leu Pro  
85 90 95

Glu Phe Ile Asp Asn Ile Arg Gln Met Val Ser Leu Met Lys Ser Tyr  
100 105 110

His Ile Arg Pro Ile Ile Ile Gly Pro Gly Leu Val Asp Arg Glu Lys  
115 120 125

Trp Glu Lys Glu Lys Ser Glu Glu Ile Ala Leu Gly Tyr Phe Arg Thr  
130 135 140

Asn Glu Asn Phe Ala Ile Tyr Ser Asp Ala Leu Ala Lys Leu Ala Asn  
145 150 155 160

Glu Glu Lys Val Pro Phe Val Ala Leu Asn Lys Ala Phe Gln Gln Glu  
165 170 175

Gly Gly Asp Ala Trp Gln Gln Leu Leu Thr Asp Gly Leu His Phe Ser  
180 185 190

Gly Lys Gly Tyr Lys Ile Phe His Asp Glu Leu Leu Lys Val Ile Glu  
195 200 205

Thr Phe Tyr Pro Gln Tyr His Pro Lys Asn Met Gln Tyr Lys Leu Lys  
210 215 220

Asp Trp Arg Asp Val Leu Asp Asp Gly Ser Asn Ile Met Ser  
225 230 235

<210> 8  
<211> 347  
<212> PRT  
5 <213> Ralstonia sp.

<400> 8

Met Asn Leu Arg Gln Trp Met Gly Ala Ala Thr Ala Ala Leu Ala Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Thr Asp Gln Ser Gly Asn Pro  
20 25 30

Asn Val Ala Lys Val Gln Arg Met Val Val Phe Gly Asp Ser Leu Ser  
35 40 45

Asp Ile Gly Thr Tyr Thr Pro Val Ala Gln Ala Val Gly Gly Gly Lys  
50 55 60

Phe Thr Thr Asn Pro Gly Pro Ile Trp Ala Glu Thr Val Ala Ala Gln



ES 2 645 041 T3

Leu Ala Arg Leu Leu Ala Asp Asn Val Ala His  
 340 345

<210> 9

<211> 261

<212> PRT

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 9

Met Ile Gly Ser Tyr Val Ala Val Gly Asp Ser Phe Thr Glu Gly Val  
 1 5 10 15

Gly Asp Pro Gly Pro Asp Gly Ala Phe Val Gly Trp Ala Asp Arg Leu  
 20 25 30

Ala Val Leu Leu Ala Asp Arg Arg Pro Glu Gly Asp Phe Thr Tyr Thr  
 35 40 45

Asn Leu Ala Val Arg Gly Arg Leu Leu Asp Gln Ile Val Ala Glu Gln  
 50 55 60

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

Gly Gly Asn Asp Ile Ile Arg Pro Gly Thr Asp Pro Asp Glu Val Ala  
 85 90 95

Glu Arg Phe Glu Leu Ala Val Ala Ala Leu Thr Ala Ala Ala Gly Thr  
 100 105 110

Val Leu Val Thr Thr Gly Phe Asp Thr Arg Gly Val Pro Val Leu Lys  
 115 120 125

His Leu Arg Gly Lys Ile Ala Thr Tyr Asn Gly His Val Arg Ala Ile  
 130 135 140

Ala Asp Arg Tyr Gly Cys Pro Val Leu Asp Leu Trp Ser Leu Arg Ser  
 145 150 155 160

Val Gln Asp Arg Arg Ala Trp Asp Ala Asp Arg Leu His Leu Ser Pro  
 165 170 175

Glu Gly His Thr Arg Val Ala Leu Arg Ala Gly Gln Ala Leu Gly Leu  
 180 185 190

Arg Val Pro Ala Asp Pro Asp Gln Pro Trp Pro Pro Leu Pro Pro Arg  
 195 200 205

ES 2 645 041 T3

Gly Thr Leu Asp Val Arg Arg Asp Asp Val His Trp Ala Arg Glu Tyr  
 210 215 220

Leu Val Pro Trp Ile Gly Arg Arg Leu Arg Gly Glu Ser Ser Gly Asp  
 225 230 235 240

His Val Thr Ala Lys Gly Thr Leu Ser Pro Asp Ala Ile Lys Thr Arg  
 245 250 255

Ile Ala Ala Val Ala  
 260

- <210> 10
- <211> 260
- <212> PRT
- 5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 10

Met Gln Thr Asn Pro Ala Tyr Thr Ser Leu Val Ala Val Gly Asp Ser  
 1 5 10 15

Phe Thr Glu Gly Met Ser Asp Leu Leu Pro Asp Gly Ser Tyr Arg Gly  
 20 25 30

Trp Ala Asp Leu Leu Ala Thr Arg Met Ala Ala Arg Ser Pro Gly Phe  
 35 40 45

Arg Tyr Ala Asn Leu Ala Val Arg Gly Lys Leu Ile Gly Gln Ile Val  
 50 55 60

Asp Glu Gln Val Asp Val Ala Ala Ala Met Gly Ala Asp Val Ile Thr  
 65 70 75 80

Leu Val Gly Gly Leu Asn Asp Thr Leu Arg Pro Lys Cys Asp Met Ala  
 85 90 95

Arg Val Arg Asp Leu Leu Thr Gln Ala Val Glu Arg Leu Ala Pro His  
 100 105 110

Cys Glu Gln Leu Val Leu Met Arg Ser Pro Gly Arg Gln Gly Pro Val  
 115 120 125

Leu Glu Arg Phe Arg Pro Arg Met Glu Ala Leu Phe Ala Val Ile Asp  
 130 135 140

Asp Leu Ala Gly Arg His Gly Ala Val Val Val Asp Leu Tyr Gly Ala  
 145 150 155 160

Gln Ser Leu Ala Asp Pro Arg Met Trp Asp Val Asp Arg Leu His Leu  
 165 170 175

ES 2 645 041 T3

Thr Ala Glu Gly His Arg Arg Val Ala Glu Ala Val Trp Gln Ser Leu  
 180 185 190

Gly His Glu Pro Glu Asp Pro Glu Trp His Ala Pro Ile Pro Ala Thr  
 195 200 205

Pro Pro Pro Gly Trp Val Thr Arg Arg Thr Ala Asp Val Arg Phe Ala  
 210 215 220

Arg Gln His Leu Leu Pro Trp Ile Gly Arg Arg Leu Thr Gly Arg Ser  
 225 230 235 240

Ser Gly Asp Gly Leu Pro Ala Lys Arg Pro Asp Leu Leu Pro Tyr Glu  
 245 250 255

Asp Pro Ala Arg  
 260

- <210> 11
- <211> 454
- <212> PRT
- <213> Streptomyces coelicolor

5

<400> 11

Met Thr Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Ala Pro Pro Thr Lys His  
 1 5 10 15

Arg Ala Leu Leu Ala Ala Ile Val Thr Leu Ile Val Ala Ile Ser Ala  
 20 25 30

Ala Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Ala Asp Asp Gly Ser Arg Asp His Ala  
 35 40 45

Leu Gln Ala Gly Gly Arg Leu Pro Arg Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ser  
 50 55 60

Thr Gly Ala Trp Val Gly Ala Trp Ala Thr Ala Pro Ala Ala Ala Glu  
 65 70 75 80

Pro Gly Thr Glu Thr Thr Gly Leu Ala Gly Arg Ser Val Arg Asn Val  
 85 90 95

Val His Thr Ser Val Gly Gly Thr Gly Ala Arg Ile Thr Leu Ser Asn  
 100 105 110

Leu Tyr Gly Gln Ser Pro Leu Thr Val Thr His Ala Ser Ile Ala Leu  
 115 120 125

ES 2 645 041 T3

Ala Ala Gly Pro Asp Thr Ala Ala Ala Ile Ala Asp Thr Met Arg Arg  
 130 135 140

Leu Thr Phe Gly Gly Ser Ala Arg Val Ile Ile Pro Ala Gly Gly Gln  
 145 150 155 160

Val Met Ser Asp Thr Ala Arg Leu Ala Ile Pro Tyr Gly Ala Asn Val  
 165 170 175

Leu Val Thr Thr Tyr Ser Pro Ile Pro Ser Gly Pro Val Thr Tyr His  
 180 185 190

Pro Gln Ala Arg Gln Thr Ser Tyr Leu Ala Asp Gly Asp Arg Thr Ala  
 195 200 205

Asp Val Thr Ala Val Ala Tyr Thr Thr Pro Thr Pro Tyr Trp Arg Tyr  
 210 215 220

Leu Thr Ala Leu Asp Val Leu Ser His Glu Ala Asp Gly Thr Val Val  
 225 230 235 240

Ala Phe Gly Asp Ser Ile Thr Asp Gly Ala Arg Ser Gln Ser Asp Ala  
 245 250 255

Asn His Arg Trp Thr Asp Val Leu Ala Ala Arg Leu His Glu Ala Ala  
 260 265 270

Gly Asp Gly Arg Asp Thr Pro Arg Tyr Ser Val Val Asn Glu Gly Ile  
 275 280 285

Ser Gly Asn Arg Leu Leu Thr Ser Arg Pro Gly Arg Pro Ala Asp Asn  
 290 295 300

Pro Ser Gly Leu Ser Arg Phe Gln Arg Asp Val Leu Glu Arg Thr Asn  
 305 310 315 320

Val Lys Ala Val Val Val Val Leu Gly Val Asn Asp Val Leu Asn Ser  
 325 330 335

Pro Glu Leu Ala Asp Arg Asp Ala Ile Leu Thr Gly Leu Arg Thr Leu  
 340 345 350

Val Asp Arg Ala His Ala Arg Gly Leu Arg Val Val Gly Ala Thr Ile  
 355 360 365

Thr Pro Phe Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Thr Glu Ala Arg Glu Thr Met  
 370 375 380

Arg Gln Glu Val Asn Glu Glu Ile Arg Ser Gly Arg Val Phe Asp Thr

ES 2 645 041 T3

385 390 395 400

Val Val Asp Phe Asp Lys Ala Leu Arg Asp Pro Tyr Asp Pro Arg Arg  
 405 410 415

Met Arg Ser Asp Tyr Asp Ser Gly Asp His Leu His Pro Gly Asp Lys  
 420 425 430

Gly Tyr Ala Arg Met Gly Ala Val Ile Asp Leu Ala Ala Leu Lys Gly  
 435 440 445

Ala Ala Pro Val Lys Ala  
 450

- <210> 12
- <211> 340
- <212> PRT
- 5 <213> Streptomyces coelicolor
- <400> 12

Met Thr Ser Met Ser Arg Ala Arg Val Ala Arg Arg Ile Ala Ala Gly  
 1 5 10 15

Ala Ala Tyr Gly Gly Gly Gly Ile Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ala Val  
 20 25 30

Gly Leu Val Val Ala Glu Val Gln Leu Ala Arg Arg Arg Val Gly Val  
 35 40 45

Gly Thr Pro Thr Arg Val Pro Asn Ala Gln Gly Leu Tyr Gly Gly Thr  
 50 55 60

Leu Pro Thr Ala Gly Asp Pro Pro Leu Arg Leu Met Met Leu Gly Asp  
 65 70 75 80

Ser Thr Ala Ala Gly Gln Gly Val His Arg Ala Gly Gln Thr Pro Gly  
 85 90 95

Ala Leu Leu Ala Ser Gly Leu Ala Ala Val Ala Glu Arg Pro Val Arg  
 100 105 110

Leu Gly Ser Val Ala Gln Pro Gly Ala Cys Ser Asp Asp Leu Asp Arg  
 115 120 125

Gln Val Ala Leu Val Leu Ala Glu Pro Asp Arg Val Pro Asp Ile Cys  
 130 135 140

Val Ile Met Val Gly Ala Asn Asp Val Thr His Arg Met Pro Ala Thr  
 145 150 155 160

ES 2 645 041 T3

Arg Ser Val Arg His Leu Ser Ser Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala  
 165 170 175

Gly Ala Glu Val Val Val Gly Thr Cys Pro Asp Leu Gly Thr Ile Glu  
 180 185 190

Arg Val Arg Gln Pro Leu Arg Trp Leu Ala Arg Arg Ala Ser Arg Gln  
 195 200 205

Leu Ala Ala Ala Gln Thr Ile Gly Ala Val Glu Gln Gly Gly Arg Thr  
 210 215 220

Val Ser Leu Gly Asp Leu Leu Gly Pro Glu Phe Ala Gln Asn Pro Arg  
 225 230 235 240

Glu Leu Phe Gly Pro Asp Asn Tyr His Pro Ser Ala Glu Gly Tyr Ala  
 245 250 255

Thr Ala Ala Met Ala Val Leu Pro Ser Val Cys Ala Ala Leu Gly Leu  
 260 265 270

Trp Pro Ala Asp Glu Glu His Pro Asp Ala Leu Arg Arg Glu Gly Phe  
 275 280 285

Leu Pro Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Ala Ala Ser Glu Ala Gly Thr  
 290 295 300

Glu Val Ala Ala Ala Met Pro Thr Gly Pro Arg Gly Pro Trp Ala Leu  
 305 310 315 320

Leu Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Val Ser Glu Ala Glu Pro Ser Ser  
 325 330 335

Pro Ser Gly Val  
 340

<210> 13  
 <211> 305  
 <212> PRT

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 13

Met Gly Arg Gly Thr Asp Gln Arg Thr Arg Tyr Gly Arg Arg Arg Ala  
 1 5 10 15

Arg Val Ala Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Val Leu Gly Val Gly Val  
 20 25 30

Ala Gly Cys Asp Ser Val Gly Gly Asp Ser Pro Ala Pro Ser Gly Ser

ES 2 645 041 T3

35					40					45					
Pro	Ser	Lys	Arg	Thr	Arg	Thr	Ala	Pro	Ala	Trp	Asp	Thr	Ser	Pro	Ala
	50					55					60				
Ser	Val	Ala	Ala	Val	Gly	Asp	Ser	Ile	Thr	Arg	Gly	Phe	Asp	Ala	Cys
65					70					75					80
Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Cys	Pro	Glu	Val	Ser	Trp	Ala	Thr	Gly	Ser	Ser
				85					90					95	
Ala	Lys	Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Asp	Ala
			100					105					110		
Ala	Glu	His	Ser	Trp	Asn	Tyr	Ala	Val	Thr	Gly	Ala	Arg	Met	Ala	Asp
		115					120					125			
Leu	Thr	Ala	Gln	Val	Thr	Arg	Ala	Ala	Gln	Arg	Glu	Pro	Glu	Leu	Val
	130					135					140				
Ala	Val	Met	Ala	Gly	Ala	Asn	Asp	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala
145				150						155					160
Met	Thr	Pro	Val	Ala	Asp	Phe	Arg	Ala	Gln	Phe	Glu	Glu	Ala	Met	Ala
				165					170					175	
Thr	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Pro	Lys	Ala	Gln	Val	Tyr	Val	Ser	Ser	Ile
			180					185					190		
Pro	Asp	Leu	Lys	Arg	Leu	Trp	Ser	Gln	Gly	Arg	Thr	Asn	Pro	Leu	Gly
		195					200					205			
Lys	Gln	Val	Trp	Lys	Leu	Gly	Leu	Cys	Pro	Ser	Met	Leu	Gly	Asp	Ala
	210					215					220				
Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Ala	Ala	Thr	Leu	Arg	Arg	Asn	Thr	Val	Arg	Asp
225					230					235					240
Arg	Val	Ala	Asp	Tyr	Asn	Glu	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Cys	Ala	Lys	Asp
				245					250					255	
Arg	Arg	Cys	Arg	Ser	Asp	Asp	Gly	Ala	Val	His	Glu	Phe	Arg	Phe	Gly
			260					265					270		
Thr	Asp	Gln	Leu	Ser	His	Trp	Asp	Trp	Phe	His	Pro	Ser	Val	Asp	Gly
		275					280					285			
Gln	Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Ile	Ala	Tyr	Arg	Ala	Val	Thr	Ala	Lys	Asn
	290					295					300				

ES 2 645 041 T3

Pro  
305

<210> 14  
<211> 268  
<212> PRT

5 <213> Streptomyces rimosus

<400> 14

Met Arg Leu Ser Arg Arg Ala Ala Thr Ala Ser Ala Leu Leu Leu Thr  
1 5 10 15

Pro Ala Leu Ala Leu Phe Gly Ala Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro Arg  
20 25 30

Ile Gln Ala Thr Asp Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly  
35 40 45

Val Gly Ala Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Gly Ser Cys Lys Arg Ser  
50 55 60

Thr Lys Ser Tyr Pro Ala Leu Trp Ala Ala Ser His Thr Gly Thr Arg  
65 70 75 80

Phe Asn Phe Thr Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ala  
85 90 95

Lys Gln Leu Thr Pro Val Asn Ser Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Thr  
100 105 110

Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp Thr Met Thr Thr Cys Asn  
115 120 125

Leu Gln Gly Glu Ser Ala Cys Leu Ala Arg Ile Ala Lys Ala Arg Ala  
130 135 140

Tyr Ile Gln Gln Thr Leu Pro Ala Gln Leu Asp Gln Val Tyr Asp Ala  
145 150 155 160

Ile Asp Ser Arg Ala Pro Ala Ala Gln Val Val Val Leu Gly Tyr Pro  
165 170 175

Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Gly Ser Cys Ala Val Gly Leu Ser Glu Lys  
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Ile Asn Ala Ala Ala Asp Asp Ile Asn Ala Val Thr  
195 200 205

ES 2 645 041 T3

Ala Lys Arg Ala Ala Asp His Gly Phe Ala Phe Gly Asp Val Asn Thr  
 210 215 220

Thr Phe Ala Gly His Glu Leu Cys Ser Gly Ala Pro Trp Leu His Ser  
 225 230 235 240

Val Thr Leu Pro Val Glu Asn Ser Tyr His Pro Thr Ala Asn Gly Gln  
 245 250 255

Ser Lys Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ser Ala Thr  
 260 265

<210> 15

<211> 336

<212> PRT

5 <213> *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*

<400> 15

Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Ile Ala Leu Thr Val  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly  
 20 25 30

Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr  
 35 40 45

Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro  
 50 55 60

Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala  
 65 70 75 80

Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser  
 85 90 95

Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr  
 100 105 110

Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu  
 115 120 125

Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln  
 130 135 140

Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met  
 145 150 155 160

Val Leu Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu  
 165 170 175

ES 2 645 041 T3

Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser  
 180 185 190

His Val Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln  
 195 200 205

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

Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu  
 225 230 235 240

Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg  
 245 250 255

Ser Val Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg  
 260 265 270

Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro  
 275 280 285

Met Ala Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe  
 290 295 300

Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu  
 305 310 315 320

Arg Ala Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly  
 325 330 335

<210> 16

<211> 318

<212> PRT

5 <213> Aeromonas salmonicida

<400> 16

Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser  
 1 5 10 15

Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro  
 20 25 30

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp  
 35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu  
 50 55 60

ES 2 645 041 T3

Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asp  
65 70 75 80

Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe  
85 90 95

Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val  
100 105 110

Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala  
115 120 125

Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu  
130 135 140

Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln  
145 150 155 160

Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val  
165 170 175

Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala  
180 185 190

Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu  
195 200 205

Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro  
210 215 220

Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val  
225 230 235 240

Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala  
245 250 255

Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala  
260 265 270

Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp  
275 280 285

Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala  
290 295 300

Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly  
305 310 315

<210> 17  
<211> 465  
<212> PRT

ES 2 645 041 T3

<213> Candida parapsilosis

<400> 17

Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala  
1 5 10 15

Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro  
20 25 30

Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg  
35 40 45

Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln  
50 55 60

Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro  
65 70 75 80

Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp  
85 90 95

Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys  
100 105 110

Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr  
115 120 125

Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr  
130 135 140

Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val  
145 150 155 160

Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu  
165 170 175

Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu  
180 185 190

Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ile  
195 200 205

Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala  
210 215 220

Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp  
225 230 235 240

ES 2 645 041 T3

Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly  
245 250 255

Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro  
260 265 270

Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp  
275 280 285

Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg  
290 295 300

Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr  
305 310 315 320

Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro  
325 330 335

Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro  
340 345 350

Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu  
355 360 365

Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu  
370 375 380

Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe  
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser  
405 410 415

Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu  
420 425 430

Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys  
435 440 445

Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala  
450 455 460

Phe  
465

<210> 18  
<211> 471  
<212> PRT

5 <213> Candida parapsilosis

ES 2 645 041 T3

<400> 18

Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala  
 1 5 10 15

Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro  
 20 25 30

Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg  
 35 40 45

Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln  
 50 55 60

Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro  
 65 70 75 80

Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp  
 85 90 95

Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys  
 100 105 110

Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr  
 115 120 125

Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr  
 130 135 140

Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val  
 145 150 155 160

Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu  
 165 170 175

Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu  
 180 185 190

Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ile  
 195 200 205

Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala  
 210 215 220

Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp  
 225 230 235 240

Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly  
 245 250 255

ES 2 645 041 T3

Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro  
 260 265 270

Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp  
 275 280 285

Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg  
 290 295 300

Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr  
 305 310 315 320

Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro  
 325 330 335

Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro  
 340 345 350

Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu  
 355 360 365

Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu  
 370 375 380

Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe  
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser  
 405 410 415

Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu  
 420 425 430

Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys  
 435 440 445

Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala  
 450 455 460

Phe His His His His His His  
 465 470

<210> 19

<211> 261

<212> PRT

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 19

ES 2 645 041 T3

Met Ile Gly Ser Tyr Val Ala Val Gly Asp Ser Phe Thr Glu Gly Val  
1 5 10 15

Gly Asp Pro Gly Pro Asp Gly Ala Phe Val Gly Trp Ala Asp Arg Leu  
20 25 30

Ala Val Leu Leu Ala Asp Arg Arg Pro Glu Gly Asp Phe Thr Tyr Thr  
35 40 45

Asn Leu Ala Val Arg Gly Arg Leu Leu Asp Gln Ile Val Ala Glu Gln  
50 55 60

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

Gly Gly Asn Asp Ile Ile Arg Pro Gly Thr Asp Pro Asp Glu Val Ala  
85 90 95

Glu Arg Phe Glu Leu Ala Val Ala Ala Leu Thr Ala Ala Ala Gly Thr  
100 105 110

Val Leu Val Thr Thr Gly Phe Asp Thr Arg Gly Val Pro Val Leu Lys  
115 120 125

His Leu Arg Gly Lys Ile Ala Thr Tyr Asn Gly His Val Arg Ala Ile  
130 135 140

Ala Asp Arg Tyr Gly Cys Pro Val Leu Asp Leu Trp Ser Leu Arg Ser  
145 150 155 160

Val Gln Asp Arg Arg Ala Trp Asp Ala Asp Arg Leu His Leu Ser Pro  
165 170 175

Glu Gly His Thr Arg Val Ala Leu Arg Ala Gly Gln Ala Leu Gly Leu  
180 185 190

Arg Val Pro Ala Asp Pro Asp Gln Pro Trp Pro Pro Leu Pro Pro Arg  
195 200 205

Gly Thr Leu Asp Val Arg Arg Asp Asp Val His Trp Ala Arg Glu Tyr  
210 215 220

Leu Val Pro Trp Ile Gly Arg Arg Leu Arg Gly Glu Ser Ser Gly Asp  
225 230 235 240

His Val Thr Ala Lys Gly Thr Leu Ser Pro Asp Ala Ile Lys Thr Arg  
245 250 255

Ile Ala Ala Val Ala

260

<210> 20  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Motivo de secuencia  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa puede ser Ala o Gly  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5)..(5)  
 15 <223> Xaa puede ser Ala, Leu o Tyr  
 <400> 20  
**Gly Xaa Asn Asp Xaa**  
 1 5  
 <210> 21  
 <211> 18  
 20 <212> PRT  
 <213> Aeromonas sp.  
 <400> 21  
**Met Lys Lys Trp Phe Val Cys Leu Leu Gly Leu Ile Ala Leu Thr Val**  
 1 5 10 15  
**Gln Ala**  
 25 <210> 22  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus subtilis  
 <400> 22  
**Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu**  
 1 5 10 15  
**Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala**  
 20 25  
 30 <210> 23  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus licheniformis  
 <400> 23  
**Met Met Arg Lys Lys Ser Phe Trp Phe Gly Met Leu Thr Ala Phe Met**  
 1 5 10 15  
**Leu Val Phe Thr Met Glu Phe Ser Asp Ser Ala Ser Ala**  
 35 20 25  
 <210> 24

ES 2 645 041 T3

<211> 1047  
 <212> ADN  
 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 24

```

atgtttaagt ttaaaaagaa tttcttagtt ggattatcgg cagctttaat gagtattagc      60
ttgttttcgg caaccgcctc tgcagctagc gccgacagcc gtcccgcctt ttcccggatc      120
gtgatgttcg gcgacagcct ctccgatacc ggcaaaatgt acagcaagat gcgcggttac      180
ctcccctcca gcccgcccta ctatgagggc cgtttctcca acggaccctg ctggctggag      240
cagctgacca aacagttccc gggctgacc atcgccaacg aagcgggaagg cggtgccact      300
gccgtggctt acaacaagat ctcttgaat cccaagtatc aggtcatcaa caacctggac      360
tacgaggtca cccagttctt gcagaaagac agcttcaagc cggacgatct ggtgatcctc      420
tgggtcggtg ccaatgacta tctggcctat ggctggaaca cggagcagga tgccaagcgg      480
gttcgcatg ccatcagcga tgcggccaac cgcgatgtac tgaacggtgc caagcagata      540
ctgctgttca acctgccgga tctgggccag aaccctcag ctcgcagtca gaagtggtc      600
gaggcgggtc gccatgtctc cgcctatcac aaccagctgc tgctgaacct ggcacgccag      660
ctggccccc cggcatggt aaagctgttc gagatcgaca agcaatttgc cgagatgctg      720
cgtgatccgc agaacttcgg cctgagcgc gtcgagaacc cctgctacga cggcggctat      780
gtgtggaagc cgtttgccac ccgcagcgtc agcaccgacc gccagctctc cgccttcagt      840
ccgcaggaac gcctcgccat cgccggcaac ccgctgctgg cacaggccgt tgccagtctc      900
atggcccgcc gcagcgccag ccccctcaac tgtgagggca agatgttctg ggatcaggta      960
cacccgacca ctgtcgtgca cgcagccctg agcagagcgc cgcaccctt catcgcgaac     1020
5  cagtacgagt tectcgcca ctgatga                                         1047
    
```

<210> 25  
 <211> 347  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Constructo de fusión utilizado para la mutagénesis  
 <400> 25

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

ES 2 645 041 T3

Met Ser Ile Ser Leu Phe Ser Ala Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ala Asp  
 20 25 30

Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser  
 35 40 45

Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser  
 50 55 60

Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu  
 65 70 75 80

Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu  
 85 90 95

Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys  
 100 105 110

Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln  
 115 120 125

Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala  
 130 135 140

Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg  
 145 150 155 160

Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly  
 165 170 175

Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro  
 180 185 190

Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val Ser Ala  
 195 200 205

Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr  
 210 215 220

Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu  
 225 230 235 240

Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro Cys Tyr  
 245 250 255

Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val Ser Thr  
 260 265 270

Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala

ES 2 645 041 T3

275

280

285

Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 290 295 300

Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val  
 305 310 315 320

His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr  
 325 330 335

Phe Ile Ala Asn Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His  
 340 345

<210> 26  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 5 <213> Streptomyces sp.

<400> 26

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

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro  
 20 25 30

Ala Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asn Gly Ala Gly  
 35 40 45

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr  
 50 55 60

Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala  
 65 70 75 80

Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly  
 85 90 95

Ala Leu Asn Ala Ser Thr Gly Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn  
 100 105 110

Asp Ala Gly Phe Ala Asp Ala Met Thr Thr Cys Val Thr Ser Ser Asp  
 115 120 125

Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr  
 130 135 140

Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg  
 145 150 155 160

ES 2 645 041 T3

Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu  
 165 170 175

Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala  
 180 185 190

Ala Ile Asn Thr Thr Ala Asp Thr Leu Asn Ser Val Ile Ser Ser Arg  
 195 200 205

Ala Thr Ala His Gly Phe Arg Phe Gly Asp Val Arg Pro Thr Phe Asn  
 210 215 220

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu  
 225 230 235 240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly  
 245 250 255

Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ala Asn Ser Ser Thr  
 260 265

- <210> 27
- <211> 548
- <212> PRT
- <213> Thermobifida sp.

5

<400> 27

Met Leu Pro His Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Val Gly Ala Phe Phe  
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Val Gly Thr Pro Gln Asp Arg Arg Leu Arg Leu Glu Cys  
 20 25 30

His Glu Thr Arg Pro Leu Arg Gly Arg Cys Gly Cys Gly Glu Arg Arg  
 35 40 45

Val Pro Pro Leu Thr Leu Pro Gly Asp Gly Val Leu Cys Thr Thr Ser  
 50 55 60

Ser Thr Arg Asp Ala Glu Thr Val Trp Arg Lys His Leu Gln Pro Arg  
 65 70 75 80

Pro Asp Gly Gly Phe Arg Pro His Leu Gly Val Gly Cys Leu Leu Ala  
 85 90 95

Gly Gln Gly Ser Pro Gly Val Leu Trp Cys Gly Arg Glu Gly Cys Arg  
 100 105 110

Phe Glu Val Cys Arg Arg Asp Thr Pro Gly Leu Ser Arg Thr Arg Asn

ES 2 645 041 T3

115					120					125					
Gly	Asp	Ser	Ser	Pro	Pro	Phe	Arg	Ala	Gly	Trp	Ser	Leu	Pro	Pro	Lys
130						135					140				
Cys	Gly	Glu	Ile	Ser	Gln	Ser	Ala	Arg	Lys	Thr	Pro	Ala	Val	Pro	Arg
145					150					155					160
Tyr	Ser	Leu	Leu	Arg	Thr	Asp	Arg	Pro	Asp	Gly	Pro	Arg	Gly	Arg	Phe
				165					170					175	
Val	Gly	Ser	Gly	Pro	Arg	Ala	Ala	Thr	Arg	Arg	Arg	Leu	Phe	Leu	Gly
			180					185					190		
Ile	Pro	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Leu	Ala	Val
		195					200					205			
Pro	Thr	Gly	Arg	Glu	Thr	Leu	Trp	Arg	Met	Trp	Cys	Glu	Ala	Thr	Gln
	210					215					220				
Asp	Trp	Cys	Leu	Gly	Val	Pro	Val	Asp	Ser	Arg	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu
225						230					235				240
Asp	Gly	Glu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Ala	Thr	Trp	Gly
				245					250					255	
Asn	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ser	Ser	Gly	Asp	Gly	Ala	Arg
			260					265					270		
Asp	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Gly	Gly	Cys	Trp	Arg	Ser	Ala
			275				280					285			
Asn	Ala	Tyr	Pro	Glu	Leu	Val	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Phe	Ala	Gly	His
	290					295					300				
Leu	Ser	Phe	Leu	Ala	Cys	Ser	Gly	Gln	Arg	Gly	Tyr	Ala	Met	Leu	Asp
305					310					315					320
Ala	Ile	Asp	Glu	Val	Gly	Ser	Gln	Leu	Asp	Trp	Asn	Ser	Pro	His	Thr
				325					330					335	
Ser	Leu	Val	Thr	Ile	Gly	Ile	Gly	Gly	Asn	Asp	Leu	Gly	Phe	Ser	Thr
			340					345					350		
Val	Leu	Lys	Thr	Cys	Met	Val	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Asp	Ser	Lys	Ala
		355					360					365			
Cys	Thr	Asp	Gln	Glu	Asp	Ala	Ile	Arg	Lys	Arg	Met	Ala	Lys	Phe	Glu
	370					375					380				

ES 2 645 041 T3

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp  
385 390 395 400

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro  
405 410 415

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn  
420 425 430

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val  
435 440 445

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe  
450 455 460

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu  
465 470 475 480

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr  
485 490 495

Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val  
500 505 510

Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu  
515 520 525

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala  
530 535 540

Gly Glu Val Gly  
545

- <210> 28
- <211> 372
- <212> PRT
- <213> Thermobifida sp.

5

<400> 28

Met Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly  
1 5 10 15

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val  
20 25 30

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln  
35 40 45

ES 2 645 041 T3

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu  
 50 55 60

Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly  
 65 70 75 80

Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg  
 85 90 95

Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala  
 100 105 110

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

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp  
 130 135 140

Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr  
 145 150 155 160

Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr  
 165 170 175

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala  
 180 185 190

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu  
 195 200 205

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp  
 210 215 220

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro  
 225 230 235 240

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn  
 245 250 255

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val  
 260 265 270

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe  
 275 280 285

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu  
 290 295 300

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr



ES 2 645 041 T3

Leu Leu Gly Glu Thr Ile Gly Glu Gln Leu Asp Gln Leu Pro Pro Gln  
 165 170 175

Leu Asp Arg Val His Glu Ala Ile Arg Asp Arg Ala Gly Asp Ala Gln  
 180 185 190

Val Val Val Thr Gly Tyr Leu Pro Leu Val Ser Ala Gly Asp Cys Pro  
 195 200 205

Glu Leu Gly Asp Val Ser Glu Ala Asp Arg Arg Trp Ala Val Glu Leu  
 210 215 220

Thr Gly Gln Ile Asn Glu Thr Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg His Asp  
 225 230 235 240

Ala Leu Phe Val Leu Pro Asp Asp Ala Asp Glu His Thr Ser Cys Ala  
 245 250 255

Pro Pro Gln Gln Arg Trp Ala Asp Ile Gln Gly Gln Gln Thr Asp Ala  
 260 265 270

Tyr Pro Leu His Pro Thr Ser Ala Gly His Glu Ala Met Ala Ala Ala  
 275 280 285

Val Arg Asp Ala Leu Gly Leu Glu Pro Val Gln Pro  
 290 295 300

<210> 30

<211> 284

<212> PRT

5 <213> *Novosphingobium aromaticivorans*

<400> 30

Met Gly Gln Val Lys Leu Phe Ala Arg Arg Cys Ala Pro Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Gly Leu Ala Pro Ala Ala Thr Val Ala Arg Glu Ala Pro  
 20 25 30

Leu Ala Glu Gly Ala Arg Tyr Val Ala Leu Gly Ser Ser Phe Ala Ala  
 35 40 45

Gly Pro Gly Val Gly Pro Asn Ala Pro Gly Ser Pro Glu Arg Cys Gly  
 50 55 60

Arg Gly Thr Leu Asn Tyr Pro His Leu Leu Ala Glu Ala Leu Lys Leu  
 65 70 75 80

Asp Leu Val Asp Ala Thr Cys Ser Gly Ala Thr Thr His His Val Leu

ES 2 645 041 T3

85 90 95

Gly Pro Trp Asn Glu Val Pro Pro Gln Ile Asp Ser Val Asn Gly Asp  
100 105 110

Thr Arg Leu Val Thr Leu Thr Ile Gly Gly Asn Asp Val Ser Phe Val  
115 120 125

Gly Asn Ile Phe Ala Ala Ala Cys Glu Lys Met Ala Ser Pro Asp Pro  
130 135 140

Arg Cys Gly Lys Trp Arg Glu Ile Thr Glu Glu Glu Trp Gln Ala Asp  
145 150 155 160

Glu Glu Arg Met Arg Ser Ile Val Arg Gln Ile His Ala Arg Ala Pro  
165 170 175

Leu Ala Arg Val Val Val Val Asp Tyr Ile Thr Val Leu Pro Pro Ser  
180 185 190

Gly Thr Cys Ala Ala Met Ala Ile Ser Pro Asp Arg Leu Ala Gln Ser  
195 200 205

Arg Ser Ala Ala Lys Arg Leu Ala Arg Ile Thr Ala Arg Val Ala Arg  
210 215 220

Glu Glu Gly Ala Ser Leu Leu Lys Phe Ser His Ile Ser Arg Arg His  
225 230 235 240

His Pro Cys Ser Ala Lys Pro Trp Ser Asn Gly Leu Ser Ala Pro Ala  
245 250 255

Asp Asp Gly Ile Pro Val His Pro Asn Arg Leu Gly His Ala Glu Ala  
260 265 270

Ala Ala Ala Leu Val Lys Leu Val Lys Leu Met Lys  
275 280

<210> 31  
<211> 268  
<212> PRT  
5 <213> Streptomyces coelicolor  
<400> 31

Met Arg Arg Phe Arg Leu Val Gly Phe Leu Ser Ser Leu Val Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ala Gln Pro  
20 25 30

ES 2 645 041 T3

Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly  
 35 40 45

Val Gly Ala Gly Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser  
 50 55 60

Thr Lys Ala His Pro Tyr Leu Trp Ala Ala Ala His Ser Pro Ser Thr  
 65 70 75 80

Phe Asp Phe Thr Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ser  
 85 90 95

Gly Gln Leu Gly Pro Leu Ser Ser Gly Thr Gly Leu Val Ser Ile Ser  
 100 105 110

Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp Thr Met Thr Thr Cys Val  
 115 120 125

Leu Gln Ser Glu Ser Ser Cys Leu Ser Arg Ile Ala Thr Ala Glu Ala  
 130 135 140

Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Lys Leu Asp Gly Val Tyr Ser Ala  
 145 150 155 160

Ile Ser Asp Lys Ala Pro Asn Ala His Val Val Val Ile Gly Tyr Pro  
 165 170 175

Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Thr Thr Cys Ile Gly Leu Ser Glu Thr Lys  
 180 185 190

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

Gln Arg Ala Ala Ala His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Arg Thr Thr  
 210 215 220

Phe Thr Gly His Glu Leu Cys Ser Gly Ser Pro Trp Leu His Ser Val  
 225 230 235 240

Asn Trp Leu Asn Ile Gly Glu Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly Gln  
 245 250 255

Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Gly Ala Ala  
 260 265

- <210> 32
- <211> 269
- <212> PRT
- 5 <213> Streptomyces avermitilis
- <400> 32

ES 2 645 041 T3

Met Arg Arg Ser Arg Ile Thr Ala Tyr Val Thr Ser Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Val Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ser Pro Ala  
20 25 30

Ala Ala Ala Thr Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly  
35 40 45

Val Gly Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser  
50 55 60

Ser Lys Ala Tyr Pro Tyr Leu Trp Gln Ala Ala His Ser Pro Ser Ser  
65 70 75 80

Phe Ser Phe Met Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ala  
85 90 95

Asn Gln Leu Gly Thr Leu Asn Ser Ser Thr Gly Leu Val Ser Leu Thr  
100 105 110

Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ser Asp Val Met Thr Thr Cys Val  
115 120 125

Leu Gln Ser Asp Ser Ala Cys Leu Ser Arg Ile Asn Thr Ala Lys Ala  
130 135 140

Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Gln Leu Asp Ser Val Tyr Thr Ala  
145 150 155 160

Ile Ser Thr Lys Ala Pro Ser Ala His Val Ala Val Leu Gly Tyr Pro  
165 170 175

Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Gly Ser Cys Leu Ala Gly Leu Ser Glu Thr  
180 185 190

Lys Arg Ser Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Ala Ile  
195 200 205

Ala Lys Arg Ala Ala Asp His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Lys Ser  
210 215 220

Thr Phe Thr Gly His Glu Ile Cys Ser Ser Ser Thr Trp Leu His Ser  
225 230 235 240

Leu Asp Leu Leu Asn Ile Gly Gln Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly  
245 250 255

Gln Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Met Asn Ser Val Ala  
260 265

ES 2 645 041 T3

<210> 33  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Streptomyces sp.

5 <400> 33

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

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro  
 20 25 30

Ala Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asn Gly Ala Gly  
 35 40 45

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr  
 50 55 60

Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala  
 65 70 75 80

Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly  
 85 90 95

Ala Leu Asn Ala Ser Thr Gly Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn  
 100 105 110

Asp Ala Gly Phe Ala Asp Ala Met Thr Thr Cys Val Thr Ser Ser Asp  
 115 120 125

Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr  
 130 135 140

Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg  
 145 150 155 160

Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu  
 165 170 175

Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala  
 180 185 190

Ala Ile Asn Thr Thr Ala Asp Thr Leu Asn Ser Val Ile Ser Ser Arg  
 195 200 205

ES 2 645 041 T3

Ala Thr Ala His Gly Phe Arg Phe Gly Asp Val Arg Pro Thr Phe Asn  
 210 215 220

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu  
 225 230 235 240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly  
 245 250 255

Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ala Asn Ser Ser Thr  
 260 265

<210> 34

<211> 317

<212> PRT

5 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 34

Ala Asp Ser Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser  
 1 5 10 15

Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro  
 20 25 30

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp  
 35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu  
 50 55 60

Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn  
 65 70 75 80

Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe  
 85 90 95

Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val  
 100 105 110

Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala  
 115 120 125

Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu  
 130 135 140

Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln  
 145 150 155 160

Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val  
 165 170 175

ES 2 645 041 T3

Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala  
 180 185 190

Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu  
 195 200 205

Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro  
 210 215 220

Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val  
 225 230 235 240

Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala  
 245 250 255

Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala  
 260 265 270

Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp  
 275 280 285

Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala  
 290 295 300

Ala Thr Phe Ile Ala Asn Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His  
 305 310 315

<210> 35  
 <211> 318  
 <212> PRT

5 <213> Aeromonas salmonicida

<400> 35

Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser  
 1 5 10 15

Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro  
 20 25 30

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp  
 35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu  
 50 55 60

Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn  
 65 70 75 80

ES 2 645 041 T3

Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe  
85 90 95

Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val  
100 105 110

Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala  
115 120 125

Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu  
130 135 140

Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln  
145 150 155 160

Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val  
165 170 175

Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala  
180 185 190

Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu  
195 200 205

Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro  
210 215 220

Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val  
225 230 235 240

Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala  
245 250 255

Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala  
260 265 270

Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp  
275 280 285

Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala  
290 295 300

Ala Thr Phe Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly  
305 310 315

- <210> 36
- <211> 1371
- <212> ADN
- <213> Streptomyces thermosacchari
- <400> 36

5

ES 2 645 041 T3

acaggccgat gcacggaacc gtacctttcc gcagtgaagc gctctcccc catcgttcgc 60  
 cgggacttca tccgcgattt tggcatgaac acttccttca acgcgcgtag cttgctacaa 120  
 gtgcggcagc agaccgcctc gttggaggct cagtgagatt gaccgatcc ctgtcggccg 180  
 catccgtcat cgtcttcgcc ctgctgctcg cgctgctggg catcagcccg gccaggcag 240  
 cgggcccggc ctatgtggcc ctgggggatt cctattcctc gggcaacggc gccggaagt 300  
 acatcgattc gagcgggtgac tgtcaccgca gcaacaacgc gtaccccgcc cgctggggcg 360  
 cggccaacgc accgtcctcc ttcaccttcg cggcctgctc gggagcgggtg accacggatg 420  
 tgatcaacaa tcagctgggc gccctcaacg cgtccaccgg cctggtgagc atcaccatcg 480  
 gcggcaatga cgcgggcttc gcggacgcga tgaccacctg cgtcaccagc tcggacagca 540  
 cctgcctcaa cgggctggcc accgccacca actacatcaa caccaccctg ctgcccggc 600  
 tcgacgcggt ctacagccag atcaaggccc gtgcccccaa cgcgcgcgtg gtcgtcctcg 660  
 gctacccgcg catgtacctg gcctcgaacc cctggtactg cctgggcctg agcaacacca 720  
 agcgcgcggc catcaacacc accgccgaca ccctcaactc ggtgatctcc tcccgggcca 780  
 cggcccacgg attccgattc ggcgatgtcc gcccgacctt caacaaccac gaactgttct 840  
 tcggcaacga ctggctgcac tctctcacc tgcgggtgtg ggagtcgtac caccacacca 900  
 gcacgggcca tcagagcggc tatctgccgg tcctcaacgc caacagctcg acctgatcaa 960  
 cgcacggccg tgcccgcctc gcgcgtcacg ctgcggcggg gcgcgcgagc gcgttgatca 1020  
 gccacagtg ccggtgacgg tcccaccgtc acggtcgagg gtgtacgtca cggtggcgcc 1080  
 gctccagaag tggaacgtca gcaggaccgt ggagccgtcc ctgacctcgt cgaagaactc 1140  
 cggggtcagc gtgatcacc ctccccgta gccggggggc aaggcggcgc cgaactcctt 1200  
 gtaggacgtc cagtctgctg gcccgcgctt gccaccgtcc gcgtagaccg ctccatggt 1260  
 cgcagccgg tcccgcgga actcgggtgg gatgtccgtg cccaaggtgg tcccgggtgt 1320  
 gtccgagagc accggggggt cgtaccggat gatgtgcaga tccaaagaat t 1371

<210> 37

<211> 267

<212> PRT

5 <213> Streptomyces thermosacchari

<400> 37

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

Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Ile Ser Pro Ala Gln Ala Ala Gly Pro  
 20 25 30

Ala Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asn Gly Ala Gly  
 35 40 45

ES 2 645 041 T3

Ser Tyr Ile Asp Ser Ser Gly Asp Cys His Arg Ser Asn Asn Ala Tyr  
50 55 60

Pro Ala Arg Trp Ala Ala Ala Asn Ala Pro Ser Ser Phe Thr Phe Ala  
65 70 75 80

Ala Cys Ser Gly Ala Val Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Gln Leu Gly  
85 90 95

Ala Leu Asn Ala Ser Thr Gly Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn  
100 105 110

Asp Ala Gly Phe Ala Asp Ala Met Thr Thr Cys Val Thr Ser Ser Asp  
115 120 125

Ser Thr Cys Leu Asn Arg Leu Ala Thr Ala Thr Asn Tyr Ile Asn Thr  
130 135 140

Thr Leu Leu Ala Arg Leu Asp Ala Val Tyr Ser Gln Ile Lys Ala Arg  
145 150 155 160

Ala Pro Asn Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Met Tyr Leu  
165 170 175

Ala Ser Asn Pro Trp Tyr Cys Leu Gly Leu Ser Asn Thr Lys Arg Ala  
180 185 190

Ala Ile Asn Thr Thr Ala Asp Thr Leu Asn Ser Val Ile Ser Ser Arg  
195 200 205

Ala Thr Ala His Gly Phe Arg Phe Gly Asp Val Arg Pro Thr Phe Asn  
210 215 220

Asn His Glu Leu Phe Phe Gly Asn Asp Trp Leu His Ser Leu Thr Leu  
225 230 235 240

Pro Val Trp Glu Ser Tyr His Pro Thr Ser Thr Gly His Gln Ser Gly  
245 250 255

Tyr Leu Pro Val Leu Asn Ala Asn Ser Ser Thr  
260 265

<210> 38  
<211> 548  
<212> PRT  
5 <213> Thermobifida fusca  
<400> 38

ES 2 645 041 T3

Met Leu Pro His Pro Ala Gly Glu Arg Gly Glu Val Gly Ala Phe Phe  
1 5 10 15

Ala Leu Leu Val Gly Thr Pro Gln Asp Arg Arg Leu Arg Leu Glu Cys  
20 25 30

His Glu Thr Arg Pro Leu Arg Gly Arg Cys Gly Cys Gly Glu Arg Arg  
35 40 45

Val Pro Pro Leu Thr Leu Pro Gly Asp Gly Val Leu Cys Thr Thr Ser  
50 55 60

Ser Thr Arg Asp Ala Glu Thr Val Trp Arg Lys His Leu Gln Pro Arg  
65 70 75 80

Pro Asp Gly Gly Phe Arg Pro His Leu Gly Val Gly Cys Leu Leu Ala  
85 90 95

Gly Gln Gly Ser Pro Gly Val Leu Trp Cys Gly Arg Glu Gly Cys Arg  
100 105 110

Phe Glu Val Cys Arg Arg Asp Thr Pro Gly Leu Ser Arg Thr Arg Asn  
115 120 125

Gly Asp Ser Ser Pro Pro Phe Arg Ala Gly Trp Ser Leu Pro Pro Lys  
130 135 140

Cys Gly Glu Ile Ser Gln Ser Ala Arg Lys Thr Pro Ala Val Pro Arg  
145 150 155 160

Tyr Ser Leu Leu Arg Thr Asp Arg Pro Asp Gly Pro Arg Gly Arg Phe  
165 170 175

Val Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly  
180 185 190

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val  
195 200 205

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln  
210 215 220

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu  
225 230 235 240

Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly  
245 250 255

Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg



ES 2 645 041 T3

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala  
 530 535 540

Gly Glu Val Gly  
 545

<210> 39  
 <211> 3000  
 <212> ADN  
 <213> Thermobifida fusca

5

<400> 39

ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcggc gtgggcgtcc aggtgcaggt gcaggttctt 60

caactgctcc agcaggatgc cgccgtggcc gtgcacgatg gccttgggca ggcctgtggt 120

ccccgacgag tacagcacc atagcggatg gtcgaacggc agcgggggtga actccagttc 180

cgcgccttcg cccgcggctt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga cagggccgca 240

gcccaggtac ggcaggacga cgggtgtgctg caggetgggc atgccgtcgc gcagggcttt 300

gagcacgtca cggcggtcga agtccttacc gccgtagcgg tagccgtcca cggccagcag 360

cactttcggg tcgatctgcg cgaaccggtc gaggacgctg cgcaccccga agtcggggga 420

acaggacgac caggtcgcac cgatcgcggc gcaggcgagg aatgcggccg tcgcctcggc 480

gatgttcggc aggtaggcca cgaccggtc gccggggccc accccgaggc tgcggagggc 540

cgcagcgate gcggcgggtg gggtcgcag ttctccccag gtccactcgg tcaacggccg 600

gagttcggac gcgtgccgga tcgccacggc tgatgggtca cggtcgcgga agatgtgctc 660

ggcgtagttg aggggtggcg cggggaacca gacggcggcg ggcattggcg cggaggcgag 720

cactgtggtg tacggggtgg cggcgcgcac ccggtagtag tcccagatcg cggaccagaa 780

tccttcgagg tcggttaccg accagcggca cagtgcctcg tagtccgggtg cgtccacacc 840

gcggtgctcc cgcaccacgc ggggtgaacgc ggtgaggtg gcgcgttctt tgcgctcctc 900

gtcgggactc cacaggatcg gcggctgctg cttgagtgtc atgaaacgcg accccttcgt 960

ggacggtgcg gatgcggtga gcgtcgggtg cctcccctaa cgctccccgg tgacggagtg 1020

ttgtgcacca catctagcac gcgggacgcg gaaaccgat ggagaaaaca cctacaaccc 1080

cggccggacg gtgggtttcg gccacacta ggggtcgggt gcctgcttgc cgggcagggc 1140

agtcccgggg tgctgtggtg cgggcgggag ggctgtcgtc tcgaggtgtg ccggcgggac 1200

actccgggcc tcagccgtac ccgcaacggg gacagttctc ctcccttcgg ggtggatgg 1260

tcccttcccc cgaaatgcgg cgagatctcc cagtcagccc ggaaaacacc cgctgtgccc 1320

aggtactctt tgcttcgaac agacaggccg gacggtccac gggggaggtt tgtgggcagc 1380

ggaccacgtg cggcgaccag acgacgggtg ttctcggta tccccgtct tgtacttgtg 1440

acagcgtca cgctggtctt ggctgtcccg acggggcgcg agacgctgtg gcgcatgtgg 1500

ES 2 645 041 T3

tgtgaggcca cccaggactg gtgcctgggg gtgccggctg actcccggg acagcctgcg 1560  
gaggacggcg agtttctgct gctttctccg gtccaggcag cgacctgggg gaactattac 1620  
gcgctcgggg attcgtactc ttcgggggac ggggcccgcg actactatcc cggcaccgcg 1680  
gtgaagggcg gttgctggcg gtccgctaac gcctatccgg agctggtcgc cgaagcctac 1740  
gacttcgccc gacacttgtc gttcctggcc tgcagcggcc agcgcggcta cgccatgctt 1800  
gacgctatcg acgaggtcgg ctccgagctg gactggaact cccctcacac gtcgctgggtg 1860  
acgatcggga tcggcggcaa cgatctgggg ttctccacgg ttttgaagac ctgcatgggtg 1920  
cgggtgccgc tgctggacag caaggcgtgc acggaccagg aggacgctat ccgcaagcgg 1980  
atggcgaaat tcgagacgac gtttgaagag ctcatcagcg aagtgcgcac ccgcgcgccg 2040  
gacgcccgga tccttgctgt gggctacccc cggatthttc cggaggaacc gaccggcgcc 2100  
tactacacgc tgaccgcgag caaccagcgg tggtcaacg aaaccattca ggagttcaac 2160  
cagcagctcg ccgaggctgt cgcggccac gacgaggaga ttgccgcgtc gggcgggggtg 2220  
ggcagcgtgg agttcgtgga cgtctaccac gcgttgacg gccacgagat cggctcggac 2280  
gagccgtggg tgaacggggt gcagttgcgg gacctcgcca ccggggtgac tgtggaccgc 2340  
agtaccttcc accccaacgc cgctgggcac cgggcggctg gtgagcgggt catcgagcag 2400  
atcgaaaccg gcccgggccg tccgctctat gccactttcg cggtggtggc gggggcgacc 2460  
gtggacactc tcgcgggcga ggtgggggtga cccggcttac cgtccggccc gcaggtctgc 2520  
gagcactgcg gcgatctggt ccactgccc a gtgcagttcg tcttcggtga tgaccagcgg 2580  
cggggagagc cggatcgttg agccgtgcgt gtctttgacg agcacacccc gctgcaggag 2640  
ccgttcgcac agttctcttc cggtgccag agtcgggtcg acgtcgatcc cagcccacag 2700  
gccgatgctg cgggccgga ccaacgcggt gccgaccagt tggtcgaggc gggcgcgcag 2760  
cacgggggcg agggcgcgga catggtccag gtaagggccg tcgcggacga ggctcaccac 2820  
ggcagtgccg accgcgcagc cgagggcggt gccgccgaag gtgctgcggt gctggccggg 2880  
gcggatcacg tcgaagactt ccgcgtcgcc taccgccgcc gccacgggca ggatgccgcc 2940  
gccagcgtt ttgccgaaca ggtagatata ggcgtcgact ccgctgtggt cgcaggcccc 3000

<210> 40  
<211> 372  
<212> PRT  
5 <213> Thermobifida fusca

<400> 40  
Val Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly  
1 5 10 15

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val  
20 25 30

ES 2 645 041 T3

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln  
35 40 45

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu  
50 55 60

Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly  
65 70 75 80

Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg  
85 90 95

Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala  
100 105 110

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

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp  
130 135 140

Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr  
145 150 155 160

Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr  
165 170 175

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala  
180 185 190

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu  
195 200 205

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp  
210 215 220

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro  
225 230 235 240

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn  
245 250 255

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val  
260 265 270

His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe  
275 280 285

ES 2 645 041 T3

Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu  
290 295 300

Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr  
305 310 315 320

Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val  
325 330 335

Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu  
340 345 350

Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala  
355 360 365

Gly Glu Val Gly  
370

- <210> 41
- <211> 300
- <212> PRT
- <213> Corynebacterium efficiens

5

<400> 41

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

Cys Ala Asp Gly Ala Arg Glu Glu Thr Ala Gly Ala Pro Pro Gly Glu  
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Ile Arg Glu Glu Gly Ala Glu Ala Ser Thr Ser Ile  
35 40 45

Thr Asp Val Tyr Ile Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ala Ala Met Gly Gly  
50 55 60

Arg Asp Gln Pro Leu Arg Gly Glu Pro Phe Cys Leu Arg Ser Ser Gly  
65 70 75 80

Asn Tyr Pro Glu Leu Leu His Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Cys Gln  
85 90 95

Gly Ala Val Thr Gly Asp Leu Leu Glu Pro Arg Thr Leu Gly Glu Arg  
100 105 110

Thr Leu Pro Ala Gln Val Asp Ala Leu Thr Glu Asp Thr Thr Leu Val  
115 120 125

Thr Leu Ser Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Gly Glu Val Ala Gly

ES 2 645 041 T3

130		135		140
Cys Ile Arg Glu Arg Ile Ala Gly Glu Asn Ala Asp Asp Cys Val Asp				
145		150		155
				160
Leu Leu Gly Glu Thr Ile Gly Glu Gln Leu Asp Gln Leu Pro Pro Gln				
		165		170
				175
Leu Asp Arg Val His Glu Ala Ile Arg Asp Arg Ala Gly Asp Ala Gln				
		180		185
				190
Val Val Val Thr Gly Tyr Leu Pro Leu Val Ser Ala Gly Asp Cys Pro				
		195		200
				205
Glu Leu Gly Asp Val Ser Glu Ala Asp Arg Arg Trp Ala Val Glu Leu				
		210		215
				220
Thr Gly Gln Ile Asn Glu Thr Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg His Asp				
		225		230
				235
Ala Leu Phe Val Leu Pro Asp Asp Ala Asp Glu His Thr Ser Cys Ala				
		245		250
				255
Pro Pro Gln Gln Arg Trp Ala Asp Ile Gln Gly Gln Gln Thr Asp Ala				
		260		265
				270
Tyr Pro Leu His Pro Thr Ser Ala Gly His Glu Ala Met Ala Ala Ala				
		275		280
				285
Val Arg Asp Ala Leu Gly Leu Glu Pro Val Gln Pro				
		290		295
				300

<210> 42  
 <211> 3000  
 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium efficiens

5

<400> 42

```

ttctggggtg ttatggggtt gttatcggct cgtcctgggt ggatcccgcc aggtggggtg      60
ttcacggggg acttttgtgt ccaacagccg agaatgagtg ccctgagcgg tgggaatgag      120
gtgggcccggg ctgtgtcgcc atgagggggc ggcgggctct gtggtgcccc gcgacccccg      180
gccccggtga gcggtgaatg aatccggct gtaatcagca tcccgtgccc accccgtcgg      240
ggaggtcagc gcccgagtg tctacgcagt cggatcctct cggactcggc catgctgtcg      300
gcagcatcgc gctcccgggt cttggcgtcc ctcggtgttt ctgcctgctg tccctggaag      360
gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat cccggatgcc cacttcggcg      420
ccatccggca attcgggcag ctccgggtgg aagtaggtgg catccgatgc gtcggtgacg      480
  
```

ES 2 645 041 T3

ccatagtggg cgaagatctc atcctgctcg aggggtgctca ggccactctc cggatcgata 540  
 toggggggcgt ccttgatggc gtccttgctg aaaccgaggt gcagcttggt ggcttccaat 600  
 ttgcaccac ggagcgggac gaggctggaa tgacggccga agagcccgtg gtggacctca 660  
 acgaaggtgg gtagtcccgt gtcacattg aggaacacgc cctccaccgc acccagcttg 720  
 tggccggagt tgtegtaggc gctggcatcc agaagggaaa cgatctcata tttgtcgggtg 780  
 tgctcagaca tgatcttctt ttgctgtcgg tgtctgggtac taccacggta gggctgaatg 840  
 caactgttat ttttctgtta ttttaggaat tgggtccatat cccacaggct ggctgtggctc 900  
 aaatcgtcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtgg tgggagccct ggtcgcgggtt 960  
 ccgtgggagg cgcctgccc cgcaggatcg tccgcatcgg cggatctggc cgtaccctcg 1020  
 cgggtgaataa aatcattctg taaccttcat cacggttggt tttaggtatc cgcctcttc 1080  
 gtectgacct cgtcccggc gcgcgggagc ccgcgggttg cggtagacag gggagacctg 1140  
 gacaccatga ggacaacggt catcgcagca agcgcattac tcttctcgc cggatgcgcg 1200  
 gatggggccc gggaggagac cgcgggtgca ccgcgggtg agtcctccgg gggcatccgg 1260  
 gaggaggggg cggaggcgtc gacaagcatc accgacgtct acatcgcct cggggattcc 1320  
 tatgcggcga tgggcgggog ggatcagccg ttacgggggtg agccgttctg cctgcgctcg 1380  
 tccggtaatt acccggaaact cctccacgca gaggtcaccg atctcacctg ccagggggcg 1440  
 gtgaccgggg atctgctcga acccaggacg ctgggggagc gcacgctgcc ggcgcagggtg 1500  
 gatgcgctga cggaggacac caccctggtc accctctcca tcggggggcaa tgacctcgga 1560  
 ttcggggagg tggcgggatg catccgggaa cggatcggcg gggagaacgc tgatgattgc 1620  
 gtggacctgc tgggggaaac catcggggag cagctcgatc agcttcccc gcagctggac 1680  
 cgcgtgcacg aggctatccg ggaccgcgcc ggggacgcgc aggttgtggt caccggttac 1740  
 ctgocgctcg tgtctgcccg ggaactgccc gaactggggg atgtctccga ggcggatcgt 1800  
 cgttggggcg ttgagctgac cgggcagatc aacgagaccg tgcgcgaggc ggccgaacga 1860  
 caogatgcc tctttgtctt gcccgacgat gccgatgagc acaccagttg tgcaccccca 1920  
 cagcagcgtt gggcggatat ccagggccaa cagaccgatg cctatccgt gcacccgacc 1980  
 tccgcccggc atgaggcgat ggcggccgcc gtcggggagc cgctgggcct ggaaccggtc 2040  
 cagccgtagc gccgggcccg cgttgtcga cgaccaacct atgccaggct gcagtcacat 2100  
 ccgcacatag cgcgcgcccg cgatggagta cgcaccatag aggatgagcc cgatgccgac 2160  
 gatgatgagc agcacactgc cgaagggttg ttccccgagg gtgcgcagag ccgagtccag 2220  
 acctcgggcc tgctccggat catgggccc aaccggcgatg acgatcaaca cccccaggat 2280  
 cccgaaggcg ataccaggg cgacataacc ggctgttccg gtgatgatga tcgcggtccc 2340  
 gacctgccct gaccccgcac ccgcctccag atcctcccgg aaatcccggg tggccccctt 2400  
 ccagaggttg tagacaccg ccccagtac caccagcccg gcgaccacia ccagaccac 2460

ES 2 645 041 T3

accccagggt tgggatagga cgggtggcgggt gacatcgggtg gcgggtctccc catcggaggt 2520  
 gctgccgccc cgggcgaagg tggaggtggt caccgccagg gagaagtaga ccatggccat 2580  
 gaccgcccc ttggcccttt ccttgaggtc ctcgcccgcc agcagctggc tcaattgcca 2640  
 gagtcccagg gccgccaggg cgatgacggc aaccacacagg aggaactgcc caccgggagc 2700  
 ctccgcgatg gtggccaggg cacctgaatt cgaggcctca tcaccogaac cgccggatcc 2760  
 agtggcgatg cgcaccgca tccaccgat gaggatgtgc agtatgccc ggacaatgaa 2820  
 accacctctg gccagggtgg tcagcgcggg gtggtcctcg gcctggtcgg cagcccgttc 2880  
 gatcgtccgt ttcgcgatc tgggtgctgcc cttatccata gctcccattg aaccgccttg 2940  
 aggggtgggc ggccactgtc agggcggatt gtgatctgaa ctgtgatgtt ccatcaacc 3000

<210> 43

<211> 268

<212> PRT

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 43

Met Arg Arg Phe Arg Leu Val Gly Phe Leu Ser Ser Leu Val Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ala Gln Pro  
20 25 30

Ala Ala Ala Asp Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly  
35 40 45

Val Gly Ala Gly Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser  
50 55 60

Thr Lys Ala His Pro Tyr Leu Trp Ala Ala Ala His Ser Pro Ser Thr  
65 70 75 80

Phe Asp Phe Thr Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ser  
85 90 95

Gly Gln Leu Gly Pro Leu Ser Ser Gly Thr Gly Leu Val Ser Ile Ser  
100 105 110

Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp Thr Met Thr Thr Cys Val  
115 120 125

Leu Gln Ser Glu Ser Ser Cys Leu Ser Arg Ile Ala Thr Ala Glu Ala  
130 135 140

Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Lys Leu Asp Gly Val Tyr Ser Ala  
145 150 155 160

ES 2 645 041 T3

Ile Ser Asp Lys Ala Pro Asn Ala His Val Val Val Ile Gly Tyr Pro  
 165 170 175

Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Thr Thr Cys Ile Gly Leu Ser Glu Thr Lys  
 180 185 190

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

Gln Arg Ala Ala Ala His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Arg Thr Thr  
 210 215 220

Phe Thr Gly His Glu Leu Cys Ser Gly Ser Pro Trp Leu His Ser Val  
 225 230 235 240

Asn Trp Leu Asn Ile Gly Glu Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly Gln  
 245 250 255

Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Leu Asn Gly Ala Ala  
 260 265

<210> 44  
 <211> 2000  
 <212> ADN

5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 44

ccccggcggcc cgtgcaggag cagcagcccg cccgcgatgt cctcgggcgt cgtcttcac 60  
 aggcctcca tcgcgtcggc gaccggcgcc gtgtagttag cccggacctc gtcccagggtg 120  
 cccgcggcga tctggcgggt ggtgcggtgc gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag 180  
 cccatcgtca cgttctccgg ctgcggttcg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgcctcg 240  
 ccgagcacct tctcggcgag gtcggcgctg gtcgccgtca ccgtgacgtc ggcgccccgg 300  
 ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tcgccctccg ccagcgtcgc gctgcggctg 360  
 tcgtcgcggg cgatccgcag cacgcgcgcg ccggggcgca gcagcgtggc gccggaccgt 420  
 acgcggtcga tgttcgccgc gtgcgagtac ggctgtcac ccgtggcgaa acggccgagg 480  
 aacagcgcgt cgacgacgtc ggacggggag tcgctgtcgt ccacgttgag ccggatcggc 540  
 agggcttcgt gcgggttcac ggacatgtcg ccatgatcgg gcacccggcc gccgcgtgca 600  
 cccgctttcc cgggcacgca cgacagggc tttctcggcg tcttccgtcc gaacttgaac 660  
 gagtgtcagc catttcttgg catggacact tccagtcaac gcgcgtagct gctaccacgg 720  
 ttgtggcagc aatcctgcta agggaggttc catgagacgt ttccgacttg tcggcttct 780  
 gagttcgtc gtcctcgcgg ccggcgcgcg cctcaccggg gcagcgaccg cccagggcggc 840  
 ccaaccggcc gccgcccagc gctatgtggc cctcggcgac tcctactcct ccgggggtcgg 900

ES 2 645 041 T3

```

agcgggcagc tacatcagct cgagcggcga ctgcaagcgc agcacgaagg cccatcccta      960
cctgtggggcg gccgcccact cgcctccac gttcagcttc accgcctgtt cgggcgcccg      1020
tacgggtgat gttctctccg gacagctcgg cccgctcagc tccggcaccg gcctcgtctc      1080
gatcagcatc ggcggcaacg acgccggttt cgccgacacc atgacgacct gtgtgctcca      1140
gtccgagagc tectgcctgt cgcggatcgc caccgcccag gcgtacgtcg actcgacgct      1200
gcccggcaag ctcgacggcg tctactcggc aatcagcgc aaggcgccga acgcccacgt      1260
cgtcgtcatc ggctaccgc gcttctacaa gctcggcacc acctgcatcg gcctgtccga      1320
gaccaagcgg acggcgatca acaaggcctc cgaccacctc aacaccgtcc tcgcccagcg      1380
cgccgcccgc cacggcttca ccttcggcga cgtaacgacc accttcaccg gccacgagct      1440
gtgctccggc agcccctggc tgcacagcgt caactggctg aacatcggcg agtcgtacca      1500
ccccaccgcg gccggccagt ccggtggcta cctgcggctc ctcaacggcg ccgcctgacc      1560
tcaggcggaa ggagaagaag aaggagcggg gggagacgag gagtgggagg ccccgccga      1620
cggggtcccc gtccccgtct ccgtctccgt cccggtcccg caagtcaccg agaacgccac      1680
cgcgtcggac gtggcccgcg ccggactccg cacctccacg cgcacggcac tctcgaacgc      1740
gccggtgtcg tcgtgcgtcg tcaccaccac gccgtcctgg cgcgagcgtc cgccgccga      1800
cgggaaggac agcgtccgcc accccgcatc ggagaccgac ccgtccgcg tcaccaccg      1860
gtagccgacc tccgcgggca gccgcccgac cgtgaacgtc gccgtgaacg cgggtgcccg      1920
gtcgtcgggc ggcggacagg cccccagta gtgggtgcgc gagcccacca cggtcacctc      1980
caccgactgc gctgcggggc                                     2000

```

```

<210> 45
<211> 269
<212> PRT
5 <213> Streptomyces avermitilis

```

```

<400> 45
Met Arg Arg Ser Arg Ile Thr Ala Tyr Val Thr Ser Leu Leu Leu Ala
1           5           10           15
Val Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ser Pro Ala
                20           25           30
Ala Ala Ala Thr Gly Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly
          35           40           45
Val Gly Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Ser Ser Gly Asp Cys Lys Arg Ser
50           55           60
Ser Lys Ala Tyr Pro Tyr Leu Trp Gln Ala Ala His Ser Pro Ser Ser
65           70           75           80

```

ES 2 645 041 T3

Phe Ser Phe Met Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Gly Asp Val Leu Ala  
85 90 95

Asn Gln Leu Gly Thr Leu Asn Ser Ser Thr Gly Leu Val Ser Leu Thr  
100 105 110

Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ser Asp Val Met Thr Thr Cys Val  
115 120 125

Leu Gln Ser Asp Ser Ala Cys Leu Ser Arg Ile Asn Thr Ala Lys Ala  
130 135 140

Tyr Val Asp Ser Thr Leu Pro Gly Gln Leu Asp Ser Val Tyr Thr Ala  
145 150 155 160

Ile Ser Thr Lys Ala Pro Ser Ala His Val Ala Val Leu Gly Tyr Pro  
165 170 175

Arg Phe Tyr Lys Leu Gly Gly Ser Cys Leu Ala Gly Leu Ser Glu Thr  
180 185 190

Lys Arg Ser Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Ala Ile  
195 200 205

Ala Lys Arg Ala Ala Asp His Gly Phe Thr Phe Gly Asp Val Lys Ser  
210 215 220

Thr Phe Thr Gly His Glu Ile Cys Ser Ser Ser Thr Trp Leu His Ser  
225 230 235 240

Leu Asp Leu Leu Asn Ile Gly Gln Ser Tyr His Pro Thr Ala Ala Gly  
245 250 255

Gln Ser Gly Gly Tyr Leu Pro Val Met Asn Ser Val Ala  
260 265

<210> 46

<211> 1980

<212> ADN

5 <213> Streptomyces avermitilis

<400> 46

ccaccgccgg gtcggcggcg agtctcctgg cctcggtcgc ggagaggttg gccgtgtagc 60

cgttcagcgc ggcgccgaac gtcttcttca ccgtgccgcc gtactcgttg atcaggccct 120

tgcccttgct cgacgcggcc ttgaagccgg tgccttctt gagcgtgacg atgtagctgc 180

ccttgatcgc ggtgggggag ccggcgccga gcaccgtgcc ctcggccggg gtggcctggg 240

cgggcagtcg ggtgaatccg cccacgaggg cgccggtcgc cacggcggtt atcgccgcca 300

ES 2 645 041 T3

tccggatctt cttgctacgc agctgtgcc aacgagggag tcctcctctg ggcagcggcg 360  
 cgctgggtg gggcgacgg ctgtggggg tgcgcgcgtc atcacgcaca cggccctgga 420  
 gcgtcgtgtt ccgccctggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggctcaaggg 480  
 agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggccg tgagcaccac 540  
 ggggcgaccc cggaaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttcctgtc aacacgcgta 600  
 gctggtacga cggttacggc agagatcctg ctaaaggag gttccatgag acgttcccga 660  
 attacggcat acgtgacctc actcctcctc gccgtcggct gcgccctcac cggggcagcg 720  
 acggcgcagg cgtccccagc cggcggggc acgggetatg tggccctcgg cgaactcgtac 780  
 tcgtccggtg tcggcgcggg cagctacctc agctccagcg gcgactgcaa gcgcagttcg 840  
 aaggcctatc cgtacctctg gcaggccggc cattcaccct cgtcgttcag tttcatggct 900  
 tgctcggggc ctcgtacggg tgatgtcctg gccaatcagc tcggcaccct gaactcgtcc 960  
 accggcctgg tctccctcac catcggaggc aacgacgcgg gcttctccga cgtcatgacg 1020  
 acctgtgtgc tccagtccga cagcgcctgc ctctcccga tcaacaaggc gaaggcgtac 1080  
 gtcgactcca cctgcccgg ccaactcgac agcgtgtaca cggcgatcag cacgaaggcc 1140  
 ccgtcggccc atgtggccgt gctgggetac ccccgtttct acaactggg cggctcctgc 1200  
 ctgcggggc tctcggagac caagcggctc gccatcaacg acgcggccga ctatctgaac 1260  
 agcggcatcg ccaagcgcgc cggcaccac ggettcacct tcggcgacgt caagagcacc 1320  
 ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagtctcga cctgctgaac 1380  
 atcggccagt cctaccaccc gaccgcccgc ggccagtcgg gcggctatct gccggctatg 1440  
 aacagcgtgg cctgagctcc cacggcctga attttaagg cctgaatttt taaggcgaag 1500  
 gtgaaccgga agcggaggcc ccgtccgtcg gggctcctgt cgcacaggtc accgagaacg 1560  
 gcacggagtt ggacgtcgtg cgcaccgggt cgcgcacctc gacggcgatc tcgttcgaga 1620  
 tcgttccgct cgtgtcgtac gtggtgacga acacctgctt ctgctgggtc tttccgcgcg 1680  
 tcgccgggaa ggacagcgtc ttccagcccg gatccgggac ctcgcccttc ttggtcaccc 1740  
 agcggctactc cacctcgacc ggcacccggc ccacctgaa ggtcgcctgt aacgtgggcg 1800  
 cctgggcggg gggcggcggg caggcaccgg agtagtcggg gtgcaacggc gtgaccgtca 1860  
 ccttcacgga ctgggcccgc ggggtcgtcg taccgcccgc gccaccgccc cctcccggag 1920  
 tggagcccga gctgtggtcg ccccgcctgt cggcgttgtc gtcctcgggg gttttcgaac 1980

<210> 47  
 <211> 372  
 <212> PRT  
 <213> Thermobifida fusca  
 <400> 47

5

ES 2 645 041 T3

Met Gly Ser Gly Pro Arg Ala Ala Thr Arg Arg Arg Leu Phe Leu Gly  
1 5 10 15

Ile Pro Ala Leu Val Leu Val Thr Ala Leu Thr Leu Val Leu Ala Val  
20 25 30

Pro Thr Gly Arg Glu Thr Leu Trp Arg Met Trp Cys Glu Ala Thr Gln  
35 40 45

Asp Trp Cys Leu Gly Val Pro Val Asp Ser Arg Gly Gln Pro Ala Glu  
50 55 60

Asp Gly Glu Phe Leu Leu Leu Ser Pro Val Gln Ala Ala Thr Trp Gly  
65 70 75 80

Asn Tyr Tyr Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Ala Arg  
85 90 95

Asp Tyr Tyr Pro Gly Thr Ala Val Lys Gly Gly Cys Trp Arg Ser Ala  
100 105 110

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

Leu Ser Phe Leu Ala Cys Ser Gly Gln Arg Gly Tyr Ala Met Leu Asp  
130 135 140

Ala Ile Asp Glu Val Gly Ser Gln Leu Asp Trp Asn Ser Pro His Thr  
145 150 155 160

Ser Leu Val Thr Ile Gly Ile Gly Gly Asn Asp Leu Gly Phe Ser Thr  
165 170 175

Val Leu Lys Thr Cys Met Val Arg Val Pro Leu Leu Asp Ser Lys Ala  
180 185 190

Cys Thr Asp Gln Glu Asp Ala Ile Arg Lys Arg Met Ala Lys Phe Glu  
195 200 205

Thr Thr Phe Glu Glu Leu Ile Ser Glu Val Arg Thr Arg Ala Pro Asp  
210 215 220

Ala Arg Ile Leu Val Val Gly Tyr Pro Arg Ile Phe Pro Glu Glu Pro  
225 230 235 240

Thr Gly Ala Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Ser Asn Gln Arg Trp Leu Asn  
245 250 255

Glu Thr Ile Gln Glu Phe Asn Gln Gln Leu Ala Glu Ala Val Ala Val

ES 2 645 041 T3

260	265	270
His Asp Glu Glu Ile Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly Ser Val Glu Phe 275 280 285		
Val Asp Val Tyr His Ala Leu Asp Gly His Glu Ile Gly Ser Asp Glu 290 295 300		
Pro Trp Val Asn Gly Val Gln Leu Arg Asp Leu Ala Thr Gly Val Thr 305 310 315 320		
Val Asp Arg Ser Thr Phe His Pro Asn Ala Ala Gly His Arg Ala Val 325 330 335		
Gly Glu Arg Val Ile Glu Gln Ile Glu Thr Gly Pro Gly Arg Pro Leu 340 345 350		
Tyr Ala Thr Phe Ala Val Val Ala Gly Ala Thr Val Asp Thr Leu Ala 355 360 365		

Gly Glu Val Gly  
370

- <210> 48
- <211> 968
- <212> ADN
- 5 <213> Thermobifida fusca

<400> 48

```

ctgcagacac cgcgcccgcc ttctcccgga tgcgtcatggt cggcgactcc ctcagcgaca      60
ccggcaagat gtactccaag atgcgcggct acctgccgtc ctccccgccg tactacgagg      120
gccgcttctc gaacggcccc gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga      180
cgatcgccaa cgaggccgag gggggcgcga ccgcagtcgc ctacaacaag atctcctgga      240
accgaagta ccaggtcatt aacaacctcg actacgaggt caccagttc ttgcagaagg      300
actcgttcaa gcccgacgac ctggtcatcc tgtgggtggg cgccaacgac tacctggcct      360
acggttgaa cacggagcag gacgccaagc gggtgccgca cgccatctcg gacgcggcaa      420
accgcatggt cctgaacggc gcgaagcaga tcctgctggt caacctgccc gacctgggcc      480
agaaccgctc cgcccgtcc cagaaggtcg tcgaggccgt ctcgcacgtg tccgcctacc      540
acaacaagct gtcctcaac ctgcgccggc agctcgcccc gacgggatg gtaagctgt      600
tcgagatcga caagcagttc gcggagatgc tgcgcgacct ccagaacttc ggctgagcg      660
acgtggagaa cccgtgctac gacggcggct acgtgtgaa gccgttcgcc acccggctcg      720
tctcgaccga ccggcagctg tcggccttct cgccccagga gcgcctggcg atcgctggca      780
accgctcct ggcacaggcg gtagcttcgc cgatggcccc ccgctcggcc tggccctca      840

```

ES 2 645 041 T3

actgcgaggg caagatgttc tgggaccagg tccacccac caccgtggtc cacgccccc 900  
 tctcggagcg cgccgccacc ttcacgcaga cccagtaaga gttcctcgcc cactagtcta 960  
 gaggatcc 968

- <210> 49
- <211> 1044
- <212> ADN
- 5 <213> *Aeromonas salmonicida*

<400> 49  
 atgaaacaac aaaaacggct ttacgccga ttgctgacgc tgttatttgc gctcatcttc 60  
 ttgctgcctc attctgcagc ttcagcagca gatacaagac cggcgtttag ccggatcgtc 120  
 atgtttggag atagcctgag cgatacgggc aaaatgtata gcaaaatgag aggctatctt 180  
 ccgtcaagcc cgccgtatta tgaaggccgc tttagcaatg gaccggtctg gctggaacaa 240  
 ctgacgaaac aatttccggg actgacgatc gctaataga cagaaggagg agcaacagcg 300  
 gtgcctata acaaaatcag ctgggacccg aaatatcagg tcatcaacaa cctggactat 360  
 gaagtcacac agtttcttca gaaagacagc ttaaaccgg atgatctggt catcctttgg 420  
 gtccggccca atgattatct ggcgtatggc tggaacacag aacaagatgc caaaagagtc 480  
 agagatgcca tcagcgatgc cgctaataga atggctctga acggcgccaa acaaatcctg 540  
 ctgtttaacc tgccggatct gggacaaaat ccgagcgcca gaagccaaaa agtcgtcgaa 600  
 gcagtcagcc atgtcagcgc ctatcataac aaactgctgc tgaacctggc aagacaattg 660  
 gcaccgacgg gaatggtaa attgtttgaa attgacaaac agtttgccga aatgctgaga 720  
 gatccgcaaa attttggcct gagcgtatgc gaaaaccctg gctatgatgg cggatatgtc 780  
 tggaaaccgt ttgccacaag aagcgtcagc acggatagac aactgtcagc gtttagcccg 840  
 caagaaagac tggcaatcgc cggaaatccg cttttggcac aagcagttgc ttcaccgatg 900  
 gcaagaagat cagcaagccc gctgaattgc gaaggcaaaa tgttttggga tcaggtccat 960  
 ccgacaacag ttgtccatgc tgccctttca gaaagagcgg cgacgtttat cgaaacacag 1020  
 tatgaatttc tggcccatgg ctga 1044

- <210> 50
- <211> 1005
- <212> ADN
- 10 <213> *Aeromonas hydrophila*

<400> 50  
 atgaaaaaat ggtttgtgtg tttattggga ttggtcgcgc tgacagttca ggcagccgac 60  
 agccgtcccg ccttctcccg gatcgtgatg tttggcgaca gcctctccga taccggcaag 120  
 atgtacagca agatgcgcgg ttacctcccc tccagccccc cctactatga gggccgcttc 180  
 tccaacgggc ccgtctggct ggagcagctg accaacgagt tcccgggcct gaccatagcc 240  
 aacgagggcg aaggcggacc gaccgccgtg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300

ES 2 645 041 T3

tatcaggtca tcaacaacct ggactacgag gtcacccagt tcctgcaaaa agacagcttc 360  
aagccggacg atctggtgat cctctgggtc ggcgccaacg actatctggc ctatggctgg 420  
aacacagagc aggatgccaa gcgggtgcmc gacgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480  
gtgctgaacg ggcgcaagga gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacccc 540  
tcggcccgca gccagaaggt ggtcgaggcg gccagccatg tctccgccta ccacaaccag 600  
ctgctgctga acctggcacg ccagctggct cccaccggca tgggtaagct gttcgagatc 660  
gacaagcagt ttgccgagat gctgcgtgat ccgcagaact tcggcctgag cgaccagagg 720  
aacgcctgct acggtggcag ctatgtatgg aagccgtttg cctcccgag cgccagcacc 780  
gacagccagc tctccgcctt caaccgcag gagcgcctcg ccatgcggg caaccgctg 840  
ctggcccagg ccgtcgccag ccccatggct gccgcagcg ccagcaccct caactgtgag 900  
ggcaagatgt tctgggatca ggtccacccc accactgtcg tgcaogcgc cctgagcgag 960  
cccgccgcca ccttcacga gagccagtac gaggtcctcg cccac 1005

<210> 51  
<211> 1011  
<212> ADN  
5 <213> Aeromonas salmonicida

<400> 51  
atgaaaaaat ggtttgttt tttattgggg ttgatcgcmc tgacagttca ggcagccgac 60  
actcgcctcg ccttctccc gatcgtgatg ttcggcgaca gcctctccga taccggcaaa 120  
atgtacagca agatgcgcmc ttacctccc tcagcccmc cctaactatga gggcctttc 180  
tccaacggac ccgtctggct ggagcagctg accaagcagt tcccgggtct gaccatcgcc 240  
aacgaagcmc aaggcggcmc cactgccgtg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300  
tatcaggtct acaacaacct ggactacgag gtcacccagt tcttgcaaaa agacagcttc 360  
aagccggacg atctggtgat cctctgggtc ggtgccaatg actatctggc atatggctgg 420  
aatacggagc aggatgccaa gcgagttcmc gatgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480  
gtactgaacg gtgccaagca gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacccc 540  
tcagcccgca gtcagaaggt ggtcgaggcg gtcagccatg tctccgccta tcacaacaag 600  
ctgctgctga acctggcacg ccagctggcc cccaccggca tggtaaagct gttcgagatc 660  
gacaagcaat ttgccgagat gctgcgtgat ccgcagaact tcggcctgag cgacgtcgag 720  
aaccctgct acgacggcmc ctatgtgtgg aagccgtttg cccccgcag cgtcagcacc 780  
gaccgccagc tctccgcctt cagtccgag gaacgcctcg ccatgcggg caaccgctg 840  
ctggcacagg ccgttgccag tcctatggcc cgcgcagcg ccagcccct caactgtgag 900  
ggcaagatgt tctgggatca ggtacacccc accactgtcg tgcaogcagc cctgagcgag 960  
cgcgcccgcca ccttcacga gaccagtac gaggtcctcg cccacggatg a 1011

ES 2 645 041 T3

<210> 52  
 <211> 888  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces coelicolor

5 <400> 52  
 atgccgaagc ctgcccttcg ccgtgtcatg accgcgacag tgcggccgct cggcacgctc 60  
 gccctcggcc tcaccgacgc caccgcccac gccgcgcccg cccaggccac tccgacctg 120  
 gactacgtcg ccctcggcga cagctacagc gccggctccg gcgtcctgcc cgtcgacccc 180  
 gccaacctgc tctgtctgcg ctcgacggcc aactaccccc acgtcatcgc ggacacgacg 240  
 ggcgcccgcc tcacggacgt cacctgcggc gccgcgaga cgcggcactt cacgcggggc 300  
 cagtaccggg gcgtcgcacc ccagttggac gcgctcggca ccggcacgga cctgggtcacg 360  
 ctaccatcg gcggcaacga caacagcacc ttcatcaacg ccatcacggc ctgcggcacg 420  
 gcgggtgtcc tcagcggcgg caagggcagc ccctgcaagg acaggcacgg cacctccttc 480  
 gacgacgaga tcgaggccaa cacgtacccc gcgctcaagg aggcgctgct cggcgtccgc 540  
 gccagggctc cccacgccag ggtggcggct ctgggtacc cgtggatcac cccggccacc 600  
 gccgacctgt cctgcttctt gaagctcccc ctgcggcccg gtgacgtgcc ctacctcggg 660  
 gccatccagg cacacctcaa cgacgcggtc cggcgggccg ccgaggagac cggagccacc 720  
 tacgtggact tctccggggg gtccgacggc cacgacgcct gcgaggcccc cggcaccgcc 780  
 tggatogaac cgctgctctt cgggcacagc ctcgttcccc tccaccccaa cggcctgggc 840  
 gagcggcgca tggccgagca cacgatggac gtccctcgcc tggactga 888

<210> 53  
 <211> 888  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces coelicolor

10 <400> 53  
 tcagtccagg ccgaggacgt ccatcgtgtg ctgggccatg cgcggctcgc ccagggcggt 60  
 ggggtggacg ggaacgaggc tgtgcccga gagcagcggc tcgatccagc ggggtgccggg 120  
 ggcctcgcag gcgtcgtggc cgtcggacac cccggagaag tccacgtagg tggctccggg 180  
 ctctcggcg gcccgccgga ccgcgtcgtt gaggtgtgcc tggatggccc gcaggtaggg 240  
 cacgtcaccg gcggcgaggg ggagcttcag gaagcaggac gggtcggcgg tggccggggg 300  
 gatccacggg tagccgagag ccgccaccct ggcgtgggga gccctggcgc ggacgccgag 360  
 cagcgcctcc ttgagcgcgg ggtacgtgtt ggcctcgatc tcgtcgtcga aggaggtgcc 420  
 gtgcctgtcc ttgcaggggc tgcccttgcc gccgctgagg acaccgccg tgccgcaggc 480  
 cgtgatggcg ttgatgaagg tgctgttgc gttgccgccg atggtgagcg tgaccaggtc 540  
 cgtgccggtg ccgagcgcgt ccaactgggg tgcgacgccc gggactggg cccgcgtgaa 600

ES 2 645 041 T3

gtcggcgggtc tgcgcggcgc cgcaggtgac gtccgtgagg cgggcgcccg tcgtgtccgc 660  
 gatgaocgtgg gggtagttgg ccgtcgagcg cagacagagc aggttggcgg ggtcgacggg 720  
 caggacgccg gagccggcgc tgtagctgtc gccgagggcg acgtagtcca gggtcggagt 780  
 ggcctggggc ggcgcggcgt gggcgggtggc gtcggtgagg ccgagggcga gcgtgccgac 840  
 ggcggcgact gtcgcgggtca tgacacggcg aagggcaggc ttcggcat 888

<210> 54  
 <211> 717  
 <212> ADN  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 54  
 atggattacg agaagtttct gttatttggg gattccatta ctgaatttgc ttttaatact 60  
 aggccatttg aagatggcaa agatcagtat gctcttgag ccgcattagt caacgaatat 120  
 acgagaaaaa tggatattct tcaaagaggg ttcaaagggt acacttctag atgggcgttg 180  
 aaaatacttc ctgagatttt aaagcatgaa tccaatattg tcatggccac aatatttttg 240  
 ggtgccaacg atgcatgctc agcaggtccc caaagtgtcc ccctccccga atttatcgat 300  
 aatattcgtc aaatgggtatc tttgatgaag tcttaccata tccgtcctat tataatagga 360  
 ccggggctag tagatagaga gaagtgggaa aaagaaaaat ctgaagaaat agctctcgga 420  
 tacttccgta ccaacgagaa ctttgccatt tattccgatg ccttagcaaa actagccaat 480  
 gaggaaaaag ttcccttcgt ggctttgaat aaggcgtttc aacaggaagg tgggtgatgct 540  
 tggcaacaac tgctaacaga tggactgcac ttttcogaa aagggtacaa aatttttcat 600  
 gacgaattat tgaaggatcat tgagacattc taccaccaat atcatcccaa aaacatgcag 660  
 tacaactga aagattggag agatgtgcta gatgatggat ctaacataat gtcttga 717

<210> 55  
 <211> 1044  
 <212> ADN  
 <213> *Ralstonia* sp.

10

<400> 55  
 atgaacctgc gtcaatggat gggcgcgcc accgctgcc ttgccttggg cttggccgcg 60  
 tgcgggggcg gtgggaccga ccagagcggc aatcccaatg tcgccaaggt gcagcgcag 120  
 gtggtgttcg gcgacagcct gagcgatatc ggcacctaca ccccgctcgc gcaggcggtg 180  
 ggcggcggca agttcaccac caaccgggc ccgatctggg ccgagaccgt ggccgcgcaa 240  
 ctgggcgtga cgctcacgcc ggcggtgatg ggctacgcca cctccgtgca gaattgcccc 300  
 aaggccggct gcttcgacta tgcgcagggc ggctcgcgcg tgaccgatcc gaacggcatc 360  
 ggccacaacg gcggcgcggg ggcgctgacc taccgggttc agcagcagct cgccaacttc 420  
 taocgggcca gcaacaacac attcaacggc aataacgatg tcgtottcgt gctggccggc 480  
 agcaacgaca ttttcttctg gaccactgcg gcggccacca gggctccgg cgtgacgcc 540

ES 2 645 041 T3

gccattgcc a cggcccaggt gcagcaggcc gcgacggacc tggtcggcta tgtcaaggac 600  
atgatcgcca aggggtgcgac gcaggtctac gtgttcaacc tgcccgcacag cagcctgacg 660  
ccggacggcg tggcaagcgg cacgaccggc caggcgcctgc tgcacgcgct ggtgggcacg 720  
ttcaacacga cgctgcaaag cgggctggcc ggcacctcgg cgcgcatcat cgacttcaac 780  
gcacaactga ccgcggcgat ccagaatggc gcctcgttcg gcttcgcaa caccagcgcc 840  
cgggcctcgg acgccaccaa gatcaatgcc ctggtgccga gcgcccggcg cagctcgcctg 900  
ttctgctcgg ccaacacgct ggtggcttcc ggtgcggacc agagctacct gttcgcgcgac 960  
ggcgtgcacc cgaccacggc cggccatcgc ctgatcgcca gcaacgtgct ggcgcgcctg 1020  
ctggcggata acgtcgcgca ctga 1044

<210> 56  
<211> 786  
<212> ADN  
5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 56  
gtgatcgggt cgtacgtggc ggtgggggac agcttcaccg agggcgtcgg cgacccccggc 60  
cccgaacggg cgttcgtcgg ctgggcccgc cggtcgcgcc tactgctcgc ggaccggcgc 120  
cccgaagggc acttcacgta cacgaacctc gccgtgcgcg gcaggtcctt cgaccagatc 180  
gtggcggaac aggtcccgcg ggtcgtcggc ctgcgcgccg acctcgtctc gttcgcggcg 240  
ggcggcaacg acatcatccg gcccggcacc gatcccgcag aggtcgcgca gcggttcgag 300  
ctggcgggtg ccgcgctgac cggcgcggcc ggaacctcct tggtgaccac cgggttcgac 360  
accggggggg tgcccgtcct caagcacctg cgcggcaaga tcgccacgta caacgggcac 420  
gtccgcgcca tcgccgaccg ctacggctgc ccggtgctcg acctgtggtc gctgcggagc 480  
gtccaggacc gcagggcgtg ggacgcccgc cggctgcacc tgtcgcggga ggggcacacc 540  
cgggtggcgc tgcgcgcggg gcaggccctg ggctcgcgcg tcccggccga ccctgaccag 600  
ccctggcccgc ccctgccgcc gcgcggcacg ctcgacgtcc ggcgcgacga cgtgcaactg 660  
gcgcgcgagt acctggtgcc gtggatcggg cgcggcgtgc ggggcgagtc gtcgggcgac 720  
cacgtgacgg ccaaggggac gctgtcggcg gacgccatca agacgcggat cgccgcggtg 780  
gcctga 786

<210> 57  
<211> 783  
10 <212> ADN  
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 57  
atgcagaaga acccgcgta caccagtctc gtcgccgtcg gcgactcctt caccgagggc 60  
atgtcggacc tgctgcccga cggctcctac cgtggctggg ccgacctcct cgccacccgg 120

ES 2 645 041 T3

atggcggccc gctccccgg cttccggtac gccaacctgg cggtgccgcg gaagctgatc 180  
 ggacagatcg tcgacgagca ggtggacgtg gccgcccga tgggagccga cgtgatcacg 240  
 ctggtcggcg ggctcaacga cacgctgccc cccaagtgcg acatggcccg ggtgcccggac 300  
 ctgctgacct aggccgtgga acggctcgcc ccgcaactgcg agcagctggt gctgatgcgc 360  
 agtcccggtc gccagggtcc ggtgctggag cgcttccggc cccgcatgga ggccctgttc 420  
 gccgtgatcg acgacctggc cgggcggcac ggcgccgtgg tcgtcgacct gtacggggcc 480  
 cagtccgtgg ccgacctcg gatgtgggac gtggaccggc tgcacctgac cggcggggc 540  
 caccgccggg tcgcccggg ggtgtggcag tcgctcggcc acgagcccga ggaccccag 600  
 tggcacgccc cgatcccggc gacgcccggc ccgggggtggg tgacgcccag gaccgcccag 660  
 gtccggttcg cccggcagca cctgctgccc tggataggcc gcaggctgac cgggcgctcg 720  
 tccggggacg gcctgccggc caagcggccc gacctgctgc cctacgagga ccccgccagg 780  
 tga 783

<210> 58  
 <211> 1365  
 <212> ADN  
 <213> Streptomyces coelicolor

5

<400> 58  
 atgacccggg gtcgtgacgg ggggtgcccgg gcgccccca ccaagcaccg tgccctgttc 60  
 gggcgatcg tcacctgat agtggcgatc tccgcccga tatacggcg agcgtcccgc 120  
 gacgacggca gcagggacca cgcgctgacg gccggaggcc gtctcccacg aggagaccgc 180  
 gccccggcgt ccaccggtgc ctgggtgggc gcctgggcca ccgaccggc cgcggcccag 240  
 ccgggcaccg agacgaccgg cctggcgggc cgctccgtgc gcaacgtcgt gcacacctcg 300  
 gtccggggca ccggcgcgcg gatcaccctc tcgaacctgt acgggcagtc gccgctgacc 360  
 gtcacacacg cctcgatcgc cctggccgccc gggcccgaca ccgcccggc gatcggccag 420  
 accatgcccg ggctcacctt cggcggcagc gcccggtga tcatcccggc gggcggccag 480  
 gtgatgagcg acaccgcccg cctcgccatc ccctacgggg cgaacgtcct ggtcaccacg 540  
 tactccccca tcccgtccgg gccggtgacc taccatccgc aggcccggca gaccagctac 600  
 ctggccgacg gcgaccgac ggcggacgtc accgcccgtc cgtacaccac ccccacgccc 660  
 tactggcgct acctgaccgc cctcgacgtg ctgagccacg aggccgacgg cacggtcgtg 720  
 gcgttcggcg actccatcac cgacggcgcc cgctcgcaga gcgacgcca ccaccgctgg 780  
 accgacgtcc tcgcccacg cctgcacgag gcggcggggc acggcccggga cacgccccgc 840  
 tacagcgtcg tcaacgaggg catcagcggc aaccggctcc tgaccagcag gccggggcgg 900  
 ccggccgaca acccgagcgg actgagccgg ttccagcggg acgtgctgga acgcaccaac 960  
 gtcaaggccg tcgtcgtcgt cctcggcgtc aacgacgtcc tgaacagccc ggaactcgcc 1020

ES 2 645 041 T3

gaccgcgacg ccatacctgac cggcctgocg accctcgtcg accgggcgca cgcgccggga 1080  
ctgcccggctcg tcggcgccac gatcacgccc ttccggcgct acggcggcta caccgaggcc 1140  
cgcgagacga tgcggcagga ggtcaacgag gagatccgct ccggccgggt ctccgacacg 1200  
gtcgtcgact tcgacaaggc cctgcgcgac ccgtacgacc cgcgcgggat gcgctccgac 1260  
tacgacagcg gcgaccacct gcaccccggc gacaaggggt acgcgcgcat gggcgcggtc 1320  
atcgacctgg ccgcgctgaa gggcgcggcg ccggtcaagg cgtag 1365

<210> 59  
<211> 1023  
<212> ADN  
5 <213> Streptomyces coelicolor

<400> 59  
atgacgagca tgtcaggggc gagggtggcg cggcggatcg cggccggcgc ggcgtacggc 60  
ggcggcggca tcggcctggc gggagcggcg gcggtcggtc tgggtggggc cgaggtgcag 120  
ctggccagac gcaggggtggg ggtgggcacg ccgaccccggg tgccgaacgc gcagggactg 180  
tacggcggca ccctgcccac ggccggcgac ccgcccgtgc ggctgatgat gctgggcgac 240  
tccacggccg ccgggcaggg cgtgcaccgg gccgggcaga cgcggggcgc gctgctggcg 300  
tccgggctcg cggcgggtggc ggagcggccg gtgcggctgg ggtcggtcgc ccagccgggg 360  
gcgtgctcgg acgacctgga ccggcaggtg gcgctgggtgc tcgccgagcc ggaccgggtg 420  
cccgacatct gcgtgatcat ggtcggcggc aacgacgtca cccaccggat gccggcgacc 480  
cgctcgggtgc ggcacctgtc ctccggcgta cggcggctgc gcacggccgg tcgggaggtg 540  
gtggtcggca cctgtccgga cctgggcacg atcgagcggg tcgggcagcc gctgcgctgg 600  
ctggcccggc gggcctcacg gcagctcggc gcggcacaga ccatcggcgc cgtcagacag 660  
ggcgggcgca cgggtgtcgt gggcgacctg ctgggtccgg agttcgcgca gaaccgcgg 720  
gagctcttcg gccccgaaa ctaccacccc tccgccgagg ggtacgccac ggccgcgatg 780  
gcggtactgc cctcgggtgtg cgcgcgctc gccctgtggc cggccgacga ggagcaccgg 840  
gacgcgctgc gccgcgaggg ctccctgccg gtggcgcgcg cggcggcgga ggcggcgtcc 900  
gaggcgggta cggaggtcgc cgcgcgatg cctacggggc ctccggggcc ctgggcgctg 960  
ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgtcg gaggcggaac cgtccagccc gtccggcgtt 1020  
tga 1023

<210> 60  
<211> 918  
10 <212> ADN  
<213> Streptomyces coelicolor

<400> 60  
atgggtcgag ggacggacca gcggacgcg tacggccgtc gccgggcgcg tgtcgcgctc 60  
gccgcctga ccgccccgt cctgggcgtg ggcgtggcgg gctgcgactc cgtgggcggc 120

ES 2 645 041 T3

gactcaccog ctccctccgg cagcccgtcg aagcggacga ggacggcgcc cgcctgggac 180  
accagcccgg cgtccgtcgc cggcgtgggc gactccatca cgcgcggctt cgacgcctgt 240  
gcggtgctgt cggactgccc ggaggtgtcg tgggcgaccg gcagcagcgc gaaggtcgac 300  
tcgctggccg tacggctgct ggggaaggcg gacgcggccg agcacagctg gaactacggg 360  
gtcaccgggg cccggatggc ggacctgacc gctcaggtga cgcgggcccgc gcagcgcgag 420  
ccggagctgg tggcgggtgat ggccggggcg aacgacgcgt gccgggccac gacctcggcg 480  
atgacgccgg tggcggactt ccgggcccag ttcgaggagg cgatggccac cctgcgcaag 540  
aagctcccca aggcgcaggt gtacgtgtcg agcatcccgg acctcaagcg gctctgggtcc 600  
cagggccgca ccaaccgct gggcaagcag gtgtggaagc tcggcctgtg cccgtcgatg 660  
ctgggcgacg cggactccct ggactcggcg gcgaccctgc ggcgcaaacac ggtgcgcgac 720  
cgggtggcgg actacaacga ggtgctgcgg gaggtctgcg cgaaggaccg gcggtgccgc 780  
agcgcgacg gcgcgggtgca cgagttccgg ttcggcacgg accagttgag ccaactgggac 840  
tggttccacc cgagtgtgga cggccaggcc cggctggcgg agatcgcta ccgcggggtc 900  
accgcgaaga atccctga 918

<210> 61  
<211> 1068  
<212> ADN  
5 <213> Streptomyces rimosus

<400> 61  
ttcatcacia cgatgtcaca acaccggcca tccgggtcat ccctgatcgt gggaatgggt 60  
gacaagcctt cccgtgacga aagggtcctg ctacatcaga aatgacagaa atcctgctca 120  
gggaggttcc atgagactgt cccgacgcgc ggccacggcg tccgcgctcc tcctcaccoc 180  
ggcgctcgcg ctcttcggcg cgagcgcgc cgtgtccgcg ccgcgaatcc aggccaccga 240  
ctacgtggcc ctcggcgact cctactctc gggggtcggc gcgggcagct acgacagcag 300  
cagtggtctc tgtaagcga gcaccaagt ctaccggcc ctgtgggccc cctcgcacac 360  
cggtaecggg ttcaacttca ccgcctgttc gggcgcccgc acaggagacg tgctggccaa 420  
gcagctgacc cgggtcaact ccggcaccga cctggtcagc attaccatcg gcggcaacga 480  
cgcgggcttc gccgacacca tgaccacctg caacctccag ggcgagagcg cgtgcctggc 540  
gcggatcgcc aaggcgcgcg cctacatcca gcagacgtg cccgccagc tggaccaggt 600  
ctacgacgcc atcgacagcc gggccccgc agcccaggtc gtcgtcctgg gctaccgcg 660  
cttctacaag ctgggcggca gctgcgccgt cggctctctg gagaagtccc gcgcggccat 720  
caacgccgcc gccgacgaca tcaacgccgt caccgccaag cgcgccgccc accacggctt 780  
cgccttcggg gacgtcaaca cgacctcgc cgggcacgag ctgtgctccg gcgccccctg 840  
gctgcacagc gtcacccttc ccgtggagaa ctctaccac cccacggcca acggacagtc 900

ES 2 645 041 T3

caagggctac ctgcccgtcc tgaactccgc cacctgatct cgcggtact ccgcccctga 960  
 cgaagtcccg cccccggcg gggettccgc gtaggtgcgc gtaccgccgt cgcccgtcgc 1020  
 gccggtggcc ccgccgtacg tgccgccgcc cccggacgcg gtcggttc 1068

<210> 62  
 <211> 1008  
 <212> ADN  
 <213> Aeromonas hydrophila

5

<400> 62  
 atgaaaaaat ggtttgtgtg tttattggga ttggtcgcgc tgacagttca ggcagccgac 60  
 agtcgccccg ctttttcccg gatcgtgatg ttcggcgaca gcctctccga taccggcaaa 120  
 atgtacagca agatgcgcgg ttacctccc tccagcccgc cctactatga gggccgtttc 180  
 tccaacggac ccgtctggct ggagcagctg accaaacagt tcccgggtct gaccatcgcc 240  
 aacgaagcgg aaggcgggtgc cactgccgtg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300  
 tatcaggtca tcaacaacct ggactacgag gtcaccagc tcttgagaa agacagcttc 360  
 aagccggacg atctgggtgat cctctgggtc ggtgccaatg actatctggc ctatggctgg 420  
 aacacggagc aggatgccaa gcgggttcgc gatgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480  
 gtactgaacg gtgccaagca gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacccg 540  
 tcagctcgca gtcagaaggt ggtcgaggcg gtcagccatg tctccgccta tcacaaccag 600  
 ctgctgctga acctggcagc ccagctggcc cccaccggca tggtaaagct gttcgagatc 660  
 gacaagcaat ttgccgagat gctgcgtgat ccgcagaact tcggcctgag cgacgctgag 720  
 aaccctgct acgacggcgg ctatgtgtgg aagccgtttg ccaccgcag cgtcagcacc 780  
 gaccgccagc tctccgcctt cagtccgag gaacgcctcg ccatcgccgg caaccgctg 840  
 ctggcacagg ccgttgccag tcctatggcc cgccgcagcg ccagccccct caactgtgag 900  
 ggcaagatgt tctgggatca ggtacaccg accactgtcg tgcacgcagc cctgagcgag 960  
 cgcgcgccca cttcategc gaaccagtac gagtccctcg cccactga 1008

<210> 63  
 <211> 1011  
 <212> ADN  
 <213> Aeromonas salmonicida subsp. Salmonicida

10

<400> 63  
 atgaaaaaat ggtttgtttg tttattgggg ttgatcgcgc tgacagttca ggcagccgac 60  
 actcgccccg ctttctcccg gatcgtgatg ttcggcgaca gcctctccga taccggcaaa 120  
 atgtacagca agatgcgcgg ttacctccc tccagcccgc cctactatga gggccgtttc 180  
 tccaacggac ccgtctggct ggagcagctg accaagcagt tcccgggtct gaccatcgcc 240  
 aacgaagcgg aaggcgggtgc cactgccgtg gcttacaaca agatctcctg gaatcccaag 300

ES 2 645 041 T3

tatcaggtca tcaacaacct ggactacgag gtcacccagt tcttgcagaa agacagcttc 360  
aagccggacg atctgggtgat cctctgggtc ggtgccaatg actatctggc atatggctgg 420  
aataccggagc aggatgccaa gcgagttcgc gatgccatca gcgatgcggc caaccgcatg 480  
gtactgaacg gtgccaaagca gatactgctg ttcaacctgc cggatctggg ccagaacctg 540  
tcagcccgcgca gtcagaaggt ggtcggaggc gtcagccatg tctccgccta tcacaacaag 600  
ctgctgctga acctggcacg ccagctggcc cccaccggca tggtaaagct gttcgagatc 660  
gacaagcaat ttgccgagat gctgcgtgat ccgcagaact tcggcctgag cgacgtcgag 720  
aaccctgct acgacggcgg ctatgtgtgg aagccgtttg ccaccgcag cgtcagcacc 780  
gaccgccagc tctccgcctt cagtccgcag gaacgcctcg ccatcgccgg caaccgctg 840  
ctggcacagg ccgttgccag tcctatggcc cgccgcagcg ccagccccct caactgtgag 900  
ggcaagatgt tctgggatca ggtacaccgg accactgtcg tgcacgcagc cctgagcgag 960  
cgcgcgccca ccttcacga gaccagtac gagttcctcg cccacggatg a 1011

<210> 64  
<211> 51  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de terminador de alfa-amilasa  
<400> 64

cgggacttac cgaagaagac catcaatgat ggttcttt ttgtcataa a 51

10 <210> 65  
<211> 59  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
15 <223> Secuencia de terminador de proteasa alcalina  
<400> 65

caagactaaa gaccgtcgc ccgttttgc aataagcgg cgaatctac ataaaaata 59

<210> 66  
<211> 61  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de terminador específica de ácido glutámico  
<400> 66

acggcogtta gatgtgacag cccggttcaa aaggaagcgg gctgtcttcg tgtattattg 60

25 t 61

<210> 67  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>

ES 2 645 041 T3

<223> Secuencia de terminador de levansasa

<400> 67

tctttaaag gaaaggctgg aatgcccggc attccagcca catgatcatc gttt 54

<210> 68

<211> 280

<212> PRT

<213> Aeromonas salmonicida

<400> 68

Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser  
1 5 10 15

Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro  
20 25 30

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp  
35 40 45

Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu  
50 55 60

Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asp  
65 70 75 80

Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe  
85 90 95

Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val  
100 105 110

Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala  
115 120 125

Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu  
130 135 140

Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln  
145 150 155 160

Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val  
165 170 175

Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala  
180 185 190

5

ES 2 645 041 T3

Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu  
 195 200 205

Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro  
 210 215 220

Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Arg Ser Ala Ser Pro  
 225 230 235 240

Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr  
 245 250 255

Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr Phe Ile Glu Thr  
 260 265 270

Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly  
 275 280

- <210> 69
- <211> 4
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Motivo de secuencia
- <220>
- <221> VARIANTE
- 10 <222> (4)..(4)
- <223> Xaa puede ser cualquiera de los siguientes residuos de aminoácidos Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, His, Gln, Thr, Asn, Met o Ser.
- <400> 69
- Gly Asp Ser Xaa**
- 1**
- 15 <210> 70
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Secuencia de consenso
- <400> 70
- Met Arg Arg Ser Arg Phe Leu Ala**
- 1 5**
- <210> 71
- <211> 8
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de consenso
- <400> 71
- Ala Leu Ile Leu Leu Thr Leu Ala**
- 1 5**
- 30

<210> 72  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 72  
**Ala Arg Ala Ala Pro**  
 1 5  
 10 <210> 73  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 15 <400> 73  
**Tyr Val Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Ser Ser Gly**  
 1 5 10  
 <210> 74  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 74  
**Gly Ala Gly Ser Tyr**  
 1 5  
 25 <210> 75  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 75  
**Ser Ser Gly Asp**  
 1  
 <210> 76  
 <211> 15  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 76  
**Arg Ser Thr Lys Ala Tyr Pro Ala Leu Trp Ala Ala Ala His Ala**  
 40 1 5 10 15  
 <210> 77  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 77

**Ser Ser Phe Ser Phe**  
 1 5

5 <210> 78  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 78

**Ala Cys Ser Gly Ala Arg Thr Tyr Asp Val Leu Ala**  
 1 5 10

15 <210> 79  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 79

**Leu Val Ser Ile Thr Ile Gly Gly Asn Asp Ala Gly Phe Ala Asp**  
 1 5 10 15

20 <210> 80  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 80

**Met Thr Thr Cys Val Leu**  
 1 5

30 <210> 81  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

35 <400> 81

**Ser Asp Ser Ala Cys Leu**  
 1 5

40 <210> 82  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 82

**Thr Leu Pro Ala**

**1**

<210> 83  
 <211> 9  
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 83

**Arg Leu Asp Ser Val Tyr Ser Ala Ile**

**1 5**

10 <210> 84  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 84

**Thr Arg Ala Pro**

**1**

20 <210> 85  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 85

**Ala Arg Val Val Val Leu Gly Tyr Pro Arg Ile Tyr**

25 **1 5 10**

<210> 86  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 86

**Leu Gly Leu Ser**

**1**

35 <210> 87  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso  
 <400> 87

**Thr Lys Arg Ala Ala Ile Asn Asp Ala Ala Asp**

**1 5 10**

<210> 88





ES 2 645 041 T3

Gly Ser Gly Thr Asn Gly Trp Gly Glu Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ser  
 20 25 30

Ala Thr Val Val Asn Asp Ala Val Ala Gly Arg Ser Ala Arg Ser Tyr  
 35 40 45

Thr Arg Glu Gly Arg Phe Glu Asn Ile Ala Asp Val Val Thr Ala Gly  
 50 55 60

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

Thr Asp Asn Gly Arg Thr Asp Cys Ser Gly Thr Gly Ala Glu Val Cys  
 85 90 95

Tyr Ser Val Tyr Asp Gly Val Asn Glu Thr Ile Leu Thr Phe Pro Ala  
 100 105 110

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

Ile Leu Ser Ser Gln Thr Pro Asn Asn Pro Trp Glu Thr Gly Thr Phe  
 130 135 140

Val Asn Ser Pro Thr Arg Phe Val Glu Tyr Ala Glu Leu Ala Ala Glu  
 145 150 155 160

Val Ala Gly Val Glu Tyr Val Asp His Trp Ser Tyr Val Asp Ser Ile  
 165 170 175

Tyr Glu Thr Leu Gly Asn Ala Thr Val Asn Ser Tyr Phe Pro Ile Asp  
 180 185 190

His Thr His Thr Ser Pro Ala Gly Ala Glu Val Val Ala Glu Ala Phe  
 195 200 205

Leu Lys Ala Val Val Cys Thr Gly Thr Ser Leu Lys Ser Val Leu Thr  
 210 215 220

Thr Thr Ser Phe Glu Gly  
 225 230

<210> 95

<211> 184

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 95

ES 2 645 041 T3

Ala Asp Thr Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg  
1 5 10 15

Met Ser Ala Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln  
20 25 30

Ser Lys Thr Ser Val Val Asn Ala Ser Ile Ser Gly Asp Thr Ser Gln  
35 40 45

Gln Gly Leu Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg  
50 55 60

Trp Val Leu Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln  
65 70 75 80

Pro Gln Gln Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys  
85 90 95

Ala Ala Asn Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn  
100 105 110

Tyr Gly Arg Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu  
115 120 125

Ala Lys Glu Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val  
130 135 140

Tyr Leu Lys Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg  
145 150 155 160

Asp Ala Gln Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met Ala Lys Gln Leu Gln Pro  
165 170 175

Leu Val Asn His Asp Ser Leu Glu  
180

<210> 96

<211> 308

<212> PRT

5 <213> Aeromonas hydrophila

<400> 96

Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser  
1 5 10 15

Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg  
20 25 30

Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Asn Glu Phe Pro  
35 40 45

ES 2 645 041 T3

Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly Gly Pro Thr Ala Val Ala  
50 55 60

Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu  
65 70 75 80

Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp  
85 90 95

Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly  
100 105 110

Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp  
115 120 125

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

Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val  
145 150 155 160

Val Glu Ala Ala Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu  
165 170 175

Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu  
180 185 190

Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly  
195 200 205

Leu Ser Asp Gln Arg Asn Ala Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Val Trp Lys  
210 215 220

Pro Phe Ala Ser Arg Ser Ala Ser Thr Asp Ser Gln Leu Ser Ala Phe  
225 230 235 240

Asn Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln  
245 250 255

Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Ala Arg Ser Ala Ser Thr Leu Asn Cys  
260 265 270

Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His  
275 280 285

Ala Ala Leu Ser Glu Pro Ala Ala Thr Phe Ile Glu Ser Gln Tyr Glu  
290 295 300

Phe Leu Ala His  
305

ES 2 645 041 T3

<210> 97  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus aculeatus

5 <400> 97

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

ES 2 645 041 T3

<210> 98  
 <211> 167  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

5 <400> 98

Leu Leu Ile Leu Gly Asp Ser Leu Ser Ala Gly Tyr Arg Met Ser Ala  
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Trp Pro Ala Leu Leu Asn Asp Lys Trp Gln Ser Lys Thr  
 20 25 30

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

Ala Arg Leu Pro Ala Leu Leu Lys Gln His Gln Pro Arg Trp Val Leu  
 50 55 60

Val Glu Leu Gly Gly Asn Asp Gly Leu Arg Gly Phe Gln Pro Gln Gln  
 65 70 75 80

Thr Glu Gln Thr Leu Arg Gln Ile Leu Gln Asp Val Lys Ala Ala Asn  
 85 90 95

Ala Glu Pro Leu Leu Met Gln Ile Arg Leu Pro Ala Asn Tyr Gly Arg  
 100 105 110

Arg Tyr Asn Glu Ala Phe Ser Ala Ile Tyr Pro Lys Leu Ala Lys Glu  
 115 120 125

Phe Asp Val Pro Leu Leu Pro Phe Phe Met Glu Glu Val Tyr Leu Lys  
 130 135 140

Pro Gln Trp Met Gln Asp Asp Gly Ile His Pro Asn Arg Asp Ala Gln  
 145 150 155 160

Pro Phe Ile Ala Asp Trp Met  
 165

<210> 99  
 <211> 295  
 <212> PRT  
 <213> Aeromonas hydrophila

10 <400> 99

ES 2 645 041 T3

Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr Ser  
1 5 10 15

Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg  
20 25 30

Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Asn Glu Phe Pro  
35 40 45

Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly Gly Pro Thr Ala Val Ala  
50 55 60

Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn Leu  
65 70 75 80

Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro Asp  
85 90 95

Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly  
100 105 110

Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser Asp  
115 120 125

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

Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys Val  
145 150 155 160

Val Glu Ala Ala Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn Gln Leu Leu Leu  
165 170 175

Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe Glu  
180 185 190

Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly  
195 200 205

Leu Ser Asp Gln Arg Asn Ala Cys Tyr Gly Gly Ser Tyr Val Trp Lys  
210 215 220

Pro Phe Ala Ser Arg Ser Ala Ser Thr Asp Ser Gln Leu Ser Ala Phe  
225 230 235 240

Asn Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln  
245 250 255

Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Ala Arg Ser Ala Ser Thr Leu Asn Cys

ES 2 645 041 T3

260

265

270

Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr Val Val His  
 275 280 285

Ala Ala Leu Ser Glu Pro Ala  
 290 295

<210> 100

<211> 50

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso

<400> 100

Arg Pro Ala Phe Ser Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp  
 1 5 10 15

Thr Gly Lys Met Tyr Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro  
 20 25 30

Pro Tyr Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln  
 35 40 45

Leu Thr  
 50

10 <210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de consenso

<400> 101

Phe Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly Gly  
 1 5 10

<210> 102

<211> 79

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso

<400> 102

25 Thr Ala Val Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asn Pro Lys Tyr Gln Val  
 1 5 10 15

ES 2 645 041 T3

Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser  
 20 25 30

Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr  
 35 40 45

Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp  
 50 55 60

Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly Ala Lys  
 65 70 75

5 <210> 103  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

<400> 103

Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg  
 1 5 10 15

Ser Gln Lys Val Val Glu Ala  
 20

10 <210> 104  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de consenso

<400> 104

Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn  
 1 5

20 <210> 105  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de consenso

<400> 105

Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys  
 1 5 10 15

25 Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln  
 20 25 30

Asn Phe Gly Leu Ser Asp  
 35

<210> 106  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso

<400> 106

**Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala**

5 1 5

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de consenso

<400> 107

**Gln Leu Ser Ala Phe**

1 5

<210> 108

15 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso

20 <400> 108

**Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala**

1 5 10 15

**Val Ala Ser Pro Met Ala**

20

<210> 109

<211> 4

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso

<400> 109

**Arg Ser Ala Ser**

1

30 <210> 110

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de consenso

<400> 110

**Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His Pro Thr Thr**

1 5 10 15

**Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu**

20

```

<210> 111
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Secuencia de consenso
<400> 111
Ala Ala Thr Phe Ile
 1                5
<210> 112
10 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de consenso
15 <400> 112
Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His
 1                5
<210> 113
<211> 1225
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Inserto XhoI que contiene el gen precursor LAT-KLM3'
<220>
<221> CDS
25 <222> (101)..(1144)
<400> 113
gcttttcttt tggaagaaaa tatagggaaa atggtacttg ttaaaaattc ggaatattta      60
tacaatatca tatgtttcac attgaaaggg gaggagaatc atg aaa caa caa aaa      115
                Met Lys Gln Gln Lys
                1                5

```

ES 2 645 041 T3

cgg ctt tac gcc cga ttg ctg acg ctg tta ttt gcg ctc atc ttc ttg 163  
 Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ala Leu Ile Phe Leu  
 10 15 20

ctg cct cat tct gca gct tca gca gca gat aca aga ccg gcg ttt agc 211  
 Leu Pro His Ser Ala Ala Ser Ala Ala Asp Thr Arg Pro Ala Phe Ser  
 25 30 35

cgg atc gtc atg ttt gga gat agc ctg agc gat acg gcc aaa atg tat 259  
 Arg Ile Val Met Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Thr Gly Lys Met Tyr  
 40 45 50

agc aaa atg aga gcc tat ctt ccg tca agc ccg ccg tat tat gaa gcc 307  
 Ser Lys Met Arg Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly  
 55 60 65

cgc ttt agc aat gga ccg gtc tgg ctg gaa caa ctg acg aaa caa ttt 355  
 Arg Phe Ser Asn Gly Pro Val Trp Leu Glu Gln Leu Thr Lys Gln Phe  
 70 75 80 85

ccg gga ctg acg atc gct aat gaa gca gaa gga gga gca aca gcg gtc 403  
 Pro Gly Leu Thr Ile Ala Asn Glu Ala Glu Gly Gly Ala Thr Ala Val  
 90 95 100

gcc tat aac aaa atc agc tgg gac ccg aaa tat cag gtc atc aac aac 451  
 Ala Tyr Asn Lys Ile Ser Trp Asp Pro Lys Tyr Gln Val Ile Asn Asn  
 105 110 115

ctg gac tat gaa gtc aca cag ttt ctt cag aaa gac agc ttt aaa ccg 499  
 Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys Asp Ser Phe Lys Pro  
 120 125 130

gat gat ctg gtc atc ctt tgg gtc gcc gcc aat gat tat ctg gcg tat 547  
 Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn Asp Tyr Leu Ala Tyr  
 135 140 145

gcc tgg aac aca gaa caa gat gcc aaa aga gtc aga gat gcc atc agc 595  
 Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val Arg Asp Ala Ile Ser  
 150 155 160 165

gat gcc gct aat aga atg gtc ctg aac gcc gcc aaa caa atc ctg ctg 643  
 Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly Ala Lys Gln Ile Leu Leu  
 170 175 180

ttt aac ctg ccg gat ctg gga caa aat ccg agc gcc aga agc caa aaa 691  
 Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser Ala Arg Ser Gln Lys  
 185 190 195

gtc gtc gaa gca gtc agc cat gtc agc gcc tat cat aac aaa ctg ctg 739  
 Val Val Glu Ala Val Ser His Val Ser Ala Tyr His Asn Lys Leu Leu  
 200 205 210

ctg aac ctg gca aga caa ttg gca ccg acg gga atg gtt aaa ttg ttt 787  
 Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly Met Val Lys Leu Phe  
 215 220 225

gaa att gac aaa cag ttt gcc gaa atg ctg aga gat ccg caa aat ttt 835  
 Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe  
 230 235 240 245

gcc ctg agc gat gtc gaa aac ccg tgc tat gat gcc gga tat gtc tgg 883  
 Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp  
 250 255 260



ES 2 645 041 T3

Gln Val Ile Asn Asn Leu Asp Tyr Glu Val Thr Gln Phe Leu Gln Lys  
 115 120 125

Asp Ser Phe Lys Pro Asp Asp Leu Val Ile Leu Trp Val Gly Ala Asn  
 130 135 140

Asp Tyr Leu Ala Tyr Gly Trp Asn Thr Glu Gln Asp Ala Lys Arg Val  
 145 150 155 160

Arg Asp Ala Ile Ser Asp Ala Ala Asn Arg Met Val Leu Asn Gly Ala  
 165 170 175

Lys Gln Ile Leu Leu Phe Asn Leu Pro Asp Leu Gly Gln Asn Pro Ser  
 180 185 190

Ala Arg Ser Gln Lys Val Val Glu Ala Val Ser His Val Ser Ala Tyr  
 195 200 205

His Asn Lys Leu Leu Leu Asn Leu Ala Arg Gln Leu Ala Pro Thr Gly  
 210 215 220

Met Val Lys Leu Phe Glu Ile Asp Lys Gln Phe Ala Glu Met Leu Arg  
 225 230 235 240

Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu Asn Pro Cys Tyr Asp  
 245 250 255

Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg Ser Val Ser Thr Asp  
 260 265 270

Arg Gln Leu Ser Ala Phe Ser Pro Gln Glu Arg Leu Ala Ile Ala Gly  
 275 280 285

Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met Ala Arg Arg Ser  
 290 295 300

Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe Trp Asp Gln Val His  
 305 310 315 320

Pro Thr Thr Val Val His Ala Ala Leu Ser Glu Arg Ala Ala Thr Phe  
 325 330 335

Ile Glu Thr Gln Tyr Glu Phe Leu Ala His Gly  
 340 345

<210> 115

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo de secuencia  
 <400> 115

**Arg Arg Ser Ala Ser**  
**1 5**

5 <210> 116  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Motivo de secuencia

10 <220>  
 <221> característica\_nueva  
 <222> (2)..(3)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 116

**Asp Xaa Xaa His**  
**1**

15 <210> 117  
 <211> 102  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 117

**ccccgctcga ggcttttctt ttggaagaaa atataggga aatggtactt gttaaaaatt 60**

**cggaatattt atacaatatc atatgtttca cattgaaag gg 102**

25 <210> 118  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

30 <400> 118

**tggaatctcg aggtttatc ctttacctg tctcc 35**

<210> 119  
 <211> 56  
 <212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de terminador de subtilisina E

<400> 119

**gctgacaaat aaaagaagc aggtatggag gaacctgct cttttacta ttattg 56**

40 <210> 120

<400> 120  
 000

<210> 121

ES 2 645 041 T3

<400> 121  
 000  
 <210> 122  
 <400> 122  
 5 000  
 <210> 123  
 <400> 123  
 000  
 <210> 124  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> Aeromonas salmonicida  
 <400> 124  
 Ala Glu Met Leu Arg Asp Pro Gln Asn Phe Gly Leu Ser Asp Val Glu  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Cys Tyr Asp Gly Gly Tyr Val Trp Lys Pro Phe Ala Thr Arg  
 20 25 30  
 Ser Val Ser Thr Asp Arg Gln Leu Ser Ala Ser Pro Gln Glu Arg Leu  
 35 40 45  
 Ala Ile Ala Gly Asn Pro Leu Leu Ala Gln Ala Val Ala Ser Pro Met  
 50 55 60  
 Ala Arg Arg Ser Ala Ser Pro Leu Asn Cys Glu Gly Lys Met Phe  
 65 70 75

15

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir leche en polvo, donde dicho procedimiento comprende:
- (a) poner en contacto la leche o una fracción de esta con una enzima lípido aciltransferasa; y
- 5 (b) secar la leche tratada con enzima para producir leche en polvo.
2. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, donde la lípido aciltransferasa se selecciona de lípido aciltransferasas en clase enzimática (E.C.). 2.3.1.x o (E.C.) 2.3.1.43.
3. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la lípido aciltransferasa es una que cuando se prueba utilizando un Ensayo de Transferasa definido en la presente, tiene al menos un 10% de actividad aciltransferasa.
- 10 4. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa que es capaz de esterificar en al menos aproximadamente un 10% del colesterol presente en la leche de inicio.
5. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima lípido aciltransferasa se caracteriza como una enzima que posee actividad aciltransferasa y que comprende el motivo de secuencia de aminoácido GDSX, donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.
- 15 6. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha lípido aciltransferasa es un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa cuyo polipéptido se obtiene por expresión de una o más de las secuencias nucleótidas que se muestran como SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 62 o SEQ ID No. 63 o una secuencia nucleótida que tiene al menos una identidad del 75% o más con ellas.
- 20 7. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha lípido aciltransferasa es un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa cuyo polipéptido se obtiene por expresión de:
- (i) la secuencia nucleótida que se muestra como SEQ ID No. 49 o una secuencia nucleótida que tiene una identidad de un 75% o más con ella;
- 30 (ii) un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido donde dicho polipéptido es al menos un 70% idéntico a la secuencia polipéptida que se muestra en la SEQ ID No. 16 o con la secuencia polipéptida que se muestra en SEQ ID No. 68; o
- (iii) un ácido nucleico que hibrida en condiciones de rigurosidad media a una sonda nucleica que comprende la secuencia nucleótida que aparece como SEQ ID No. 49.
- 35 8. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha lípido aciltransferasa es un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa cuyo polipéptido comprende una o más de las secuencias de aminoácido que se muestran como SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácido que tiene al menos una identidad del 75% o más con ellas.
- 40 9. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dicha lípido aciltransferasa es un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa, cuyo polipéptido comprende la secuencia de aminoácido que se muestra como SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de un 75% o más con ellas.
- 45 10. Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la leche tratada con enzima se seca por pulverización para producir leche en polvo.
11. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 10, donde la leche tratada con enzima se coloca dentro del secador por pulverización a una temperatura que oscila entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 95°C.
- 50 12. Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 10 u 11, donde la temperatura del aire de salida del secador por pulverización oscila entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 150°C.

- 13.** Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la temperatura de salida del producto del secador por pulverización oscila entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 60°C.
- 14.** Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la leche tratada con enzima se seca con tambor para producir leche en polvo.
- 5 **15.** Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 14, donde la temperatura del tambor oscila entre aproximadamente 90° y aproximadamente 150°C.
- 16.** Una leche en polvo obtenible u obtenida mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 17.** Un producto lácteo producido mediante la rehidratación de la leche en polvo de la reivindicación 16.
- 18.** El uso de una lípido aciltransferasa en la fabricación de leche en polvo para:
- 10 a) mejorar las propiedades rehidratación de la leche en polvo o
- b) reducir el contenido de colesterol de la leche en polvo o
- c) reducir el contenido de ácido graso libre de la leche en polvo en comparación con la leche en polvo que, durante su fabricación, ha sido tratada con una fosfolipasa o
- d) mejorar el fluido de la leche en polvo o
- 15 e) reducir la suciedad del equipo utilizado en la fabricación de la leche en polvo;
- donde la leche o una fracción de esta está en contacto con la enzima lípido aciltransferasa y la leche tratada con enzima se seca.
- 19.** El uso de conformidad con la reivindicación 18, donde las propiedades de rehidratación mejoradas comprenden una reducción en la humectabilidad de la leche en polvo.
- 20 **20.** El uso de conformidad con la reivindicación 19, donde la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9.

FIGURA 1

SEQ ID No. 16

```

1  ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTKQFPGLT
61  IANEAEGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVLV WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LFNLPDLGQ NPSARSQKV V EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241 STDRQLSAFS PQLRLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301 SERAATFIET QYEFLAHG

```

FIGURA 2

(SEQ ID No. 1)

```

1  MKKWFVCLLG LVALTVQAAD SRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51  SSEPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNPK
101 YQVINNLDYE VTQFLQKDSF KPDDLVLVW GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
151 DAISDAANRM VLNGAKQILL FNLPLDGQNP SARSQKVVEA VSHVSAYHNQ
201 LLLNLRQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASEPMA RRSASEPLNCE
301 GKMFWQVHP TTVVHAALSE RAATFIANQY EFLAH*

```

## FIGURA 3

(SEQ ID No. 2)

```

1 ivafGDSlTd geayygdsgd ggwgagladr Ltallrlrar prgvdvfnrg isGrtsdGr1
61 ivDalvallF laqslglpnL pPYLsgdflr GANFAsagAt Ilptsqpfli QvqFkdFksq
121 vlelrqalgl lqellrllpv ldakspdlvt imiGtNDlit saffgpkste sdrnsvvpef
181 kdnlrqlikr Lrsnngarii vlitlvilnl gplGClPlkl alalassknv dasgclerln
241 eavadfneal relaiskled qlrkdglp dv kgadvpyvDl ysifqldgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNynrvCG naglcnvtak aCnpssylls flfwDgfhps ekGykavAea
361 1

```

## FIGURA 4

(SEQ ID No. 3)

```

1 mkkwfvcllg lvaltvqaad srpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylyp sspyyegrf
61 sngpvwleql tnefpghtia neaeggptav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlingakeill fnlpdlgqnp
181 sarsqkvvea ashvsayhnq lllnlarqla ptgmvklfei dkqfaemlrd pqnfglsdqr
241 nacyggsyvw kpfasrsast dsqlsafnpq erlaiagnpl laqavaspma arsastlnce
301 gkmfwdqvhp ttvvhhaalse paatfiesqy eflah

```

## FIGURA 5

## SEQ ID No. 4

```

1 mkkwfvcllg lialtvqaad trpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylp sspyyegr
61 sngpvwleql tkqfpgltia neaeggatav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlivilw gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakqill fnlpdlgqnp
181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlarqla ptgmvklfei dkqfaemlrd pgnfglsdve
241 npcydggvww kpfatrsvst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspma rrsasplnce
301 gkmfwdqvhp ttvhaalse raatfietqy eflahg

```

## FIGURA 6

## SEQ ID No. 5

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadt garltdvtcg aaqtadftra qyppgapqld algtgtdlvt
121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgywitpat edpscflklp laagdvpplr aiqahindav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgr wiepllfghs lvpvhpnalg ermaehtmd vlgd

```

## FIGURA 7

## SEQ ID No. 6

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadt garltdvtcg aaqtadftra qyppgapqld algtgtdlvt
121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgywitpat edpscflklp laagdvpplr aiqahindav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgr wiepllfghs lvpvhpnalg ermaehtmd vlgd

```

## FIGURA 8

## SEQ ID No. 7

```

1 mdyekfllfg dsitefafnt rpiedgkdqy algaalvney trkmdilqrg fkgytsrwal
61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagp qsvplpefid nizqmvslmk syhirpiiig
121 pglvdrekwe kekseeialg yfrtnefai ysdalaklan eekvpfvaln kafqgegda
181 wqqltdglh fsgkgykifh dellkvietf ypqyhpknmq yklkdwrdbl ddgsnims

```

FIGURA 9

(SEQ ID No. 8)

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

FIGURA10 (SEQ ID No. 9)

```

1 migsyvavgd sftegvvgdg pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgrlldqi
61 vaegvprvvg lepdlvsfaa ggndiirpgt dpdevaerfe lavaaltaaa gtvlvttgfd
121 trgvovlkhl rgklatyngh vraiadrygc pvldlwslrs vqdrrawdada rhlhspgght
181 rvalragqal glrvpadpdq pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
241 hvtakgtlsp daiktriaav a

```

FIGURA 11

(SEQ ID No. 10)

```

1 mqtnpaytsi vavgsdftg msdllpdgsy rgwadilatrr maarspgfry anlavrgekli
61 qqivdeqvdv aaamgadvit lvggldtllr pkcdmarvrd lltqaverla phceqlvlmr
121 spgrqgppvl rfrprmealf aviddlagrh gavvvdlyga qsladprmwv vdrhlhtaeg
181 hrrvaeavwq slghepedpe whapipatpp pgwvtrrtad vrfarqhlip wigrlltgrs
241 sgdglpakrp dllypedpar

```

FIGURA 12

(SEQ ID No. 11)

```

1 mtrgrdggag apptkhrall aaivtlivai saaiyagasa ddgsrdhalq aggrlprgda
61 apastgawvg awatapaaac pgtettglag rsvrnvvhts vggtagariti snlyggsplt
121 vthasialaa gpdtaaaiaad tmrrltfjgs arvilpaggq vmsdtarlai pyganvlvtt
181 yspipsgpvt yhpqazqtsy ladgdrtadv tavayttptp ywryltaldv lsheadgtvv
241 afgdsitdga rsgsdanhrw tdvlaarlhe aagdgdrdtp ysvvnegisg nrlitsrpgr
301 padnpsglr fqrdivlertn vkavvvvlv ndvinspela drdailtqlr tlvdraharg
361 lrvvgatitp fgygygytea retnrgevne eirsgrvfdt vvdfdkalrd pydprmrmsd
421 ydsqdhllpg dkygarmgav idlaalkgea pvka

```

FIGURA 13 (SEQ ID No. 12)

```

1 mtsmsrarva rriaagaayg gggiglagaa avglvvaevq larrivvgvt ptrvpaqgl
61 yggtlptagd pplrlmmlgd staagqgvhr agqtpgalla sglaavaerp vrlgsvaqpg
121 acsddldrqv alvlaepdrv pdicvimvga ndvthmpat rsvrhlssav rrlrtagaev
181 vvgtcpdlgt iervrqlrw larrasrqla aaqtigaveq ggtrvslgdl lgpefaqnpr
241 elfgpdnyhp saegyataam avlpsvcaal glwpadeehp dalrregflp varaaaaaas
301 eagtevaam ptgprgpwal lkrrrrrvs eaepsspsgv

```

FIGURA 14 (SEQ ID No. 13)

```

1 mgrgtdqrrr ygrrrarval aaltaavlgv gvagcdsvvg dspapsgeps krtrtapawd
61 tspasvaavg dsitrgfdac avlsdcpevs watgssakvd slavrligka daaehswnya
121 vtgarmadit aqvtraaqre pelvavmaga ndacrsttsa mtpvadfrac feeamatlrk
181 klpkaaqvys sipdlkrlws qgrtnplgkq vwkllqlpsm lgdadslds atlrntvrd
241 rvadynevlr evcakdrrcr sddgavhefr fgtdqlshwd wfhpsvdgqa rlaeiayrav
301 taknp

```

FIGURA15 (SEQ ID No. 14)

```

1 mrlsrraata salltpala lfgasaavsa priqatdyva lgdsyssvgv agsydsssqs
61 ckrstksypa lwaashtgtr fnftacsgr tgdlvakqlt pvnsqtdlvs itiggndagf
121 adtmtonlq gesaclaria karayiqqt1 paqldqvyda idsrapaaqv vvlgyprfyk
181 lggscavgl5 eksraainaa addinavtak raadhgfafg dvnttfaghe lcsgapwlhs
241 vtlpvensyh ptangcasky lplvlnsat

```

FIGURA 16 (SEQ ID No. 15)

```

1 MKKWFVCLLG LIALTVQAAD TRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRCYLP
51 SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNPK
101 YQVINNL DYE VTQFLQKDSF KPDDLVLWV GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
151 DAISDAANRM VLNGAKQILL FNLPDLGQNP SARSQKVVEA VSHVSAYHNK
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMA RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAAFFIETQY EFLAEG*

```

FIGURA 17 (SEQ ID No. 19)

```

1 migsyvavgd sftegvgdpg pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgrlldqi
61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpgt dpdevaerfe lavaaltaaa gtvlvttgfd
121 trgvpvkhl rgkياتyngh vraiadrygc pvldlwsirs vqdrrawdada rhlispeght
181 rvalragqal glrvpadpdq pwplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
241 nvtakgtlsp daiktriaav a

```

FIGURA 18 (SEQ ID No. 25)

1 MFKEKKNFLV GLSAALMSIS LFSATASAAS ADSRPAFSRI VMFGDSLSDT  
51 GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT IANEAEGGAT  
101 AVAYNKISWN PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY  
151 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLENLPDLGQ NPSARSQKVV  
201 EAVSHVSAYH NQLLLNLARQ LAPTMGVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD  
251 VENPCYDGGY VWKPFATRSV STDRQLSAFS PQRERLAIAGN PLLAQAVASP  
301 MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL SERAATFIAN QYEF<sup>LAH</sup>\*\*

FIGURA 19

(SEQ ID NO. 26)

MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN  
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSITIGGNDAGFADAMTT  
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC  
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE  
SYHPTSTGHQSGYLEPVLNANSST

FIGURA 20

SEQ ID No. 27

ZP 00058717

```

1 mlphpagerg evgaffallv gtpqdrllrl echetrplrg rcgcgerrvp pltlpgdgv1
61 cttstrdae tvwrkhlqpr pdggfzphlg vqcllagqgs pgvlwcgreg crfevcrrdt
121 pglstrngd ssppfragws lppkcgaisq sarktpavpr ysllrtdrpd gprgrfvagag
181 praatrrrif lgipalvlvt altlvlavpt gretlwrnmc eatgdwclgv pvdsrgqpae
241 dgeflllspv gaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwsana ypelvaeayd
301 faghlsflac sgrgyamld aidevgsqld wnsphtslvt igiggndlgf stvlkctmvr
361 vplldskact dqedairkrm akfettfeel isevrtrapd arilvvgypr ifpeeptgay
421 yltasnqrw lnetiqefnq qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdyha ldgheigsde
481 pwvngvqlrd latgvtvdrs tfhpnaaghr avgervieqi etgprplya tfavvagatv
541 dtlagevg

```

FIGURA 21

(SEQ ID No. 28)

```

1 mgsgpraatr rrlflgipal vlvtaltlvt avptgretlw rmwceatqdw clgvpvdsrg
61 qpaedgefl1 lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlqfstvlkt
181 cmvrvpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilv gyprifpeep
241 tgayyiltas nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeiaas ggvgsvfvd vyhaldghei
301 gsdepwngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietgpr plyatfavva
361 gatvdtlage vg

```

FIGURA 22

(SEQ ID No. 29)

```

1 mrttviaasa llllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyialgdsya
61 amggrdqplr gepfclrsg nypellhaev tdltcggavt gdlleprtlg ertlpaqvda
121 lteditlvtl siggndlgfg evagcireri agenaddcvd llgetigeql dqlppqldrv
181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpel gdvseadrrw aveltggine tvreaaerhd
241 alfvlpdcad ehtscappqq rwadiqqqt dayplhptsa gheamaavr dalglepvqp
    
```

FIGURA 23

(SEQ ID No. 30)

ZP\_00094165

```

1 mgqvklfarr capvllalag lapaatvare aplaegaryv algssfaagp gvgpnapgsp
61 ercgrgtiny phllaealkl dlvdatscga tthhvlgpwn evppqidsvn gdtrlvlti
121 ggndvsfvgn ifaaacekma spdprcgkwr eiteewqad eermrsivrq iharaplarv
181 vvdyyitvlp psgtcaamai spdrlaqsrs aakrlarita rvareegasl lkfshisrrh
241 hpcsakpsn glsapaddgi pvhpnrlgha eaaaalvklv klmk //
    
```

FIGURA 24

SEQ ID No. 31

NP\_625998.

```

1 mrrfrlvglf ssvlaagaa ltgaataqaa qpaaadgyva lgdsyssgvg agsyiessgd
61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgar tgdvlsqqlg plssqgtglvs isigndagf
121 adtmttcvlq sessclsria taeayvdstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigyprfyk
181 lgttciglse tkrtainkas dhlnvqlaqr aaahgftfgd vrttftghel csgspwlhsv
241 nwlningesyh ptaagqsggy lplvngaa

```

//

FIGURA 25

SEQ ID No. 32

NP\_827753.

```

1 mrrsrityav tslllavgca ltgaataqas paaaatgyva lgdsyssgvg agsylvssgd
61 ckrskkapy lwqaahspes fsfmacsgar tgdvlanqlg tlnsstglvs ltigndagf
121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk
181 lggscлагls etkrsainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icssstwlhs
241 ldllnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva

```

//

FIGURA 26

SEQ ID No. 33

```

MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDS SSGDCHRSN
NAYPARWAAAANAPSSFFFAACSGAVTTDVINNLGALNASTGLVSIITIGNDAGFADAMTT
CVTSSDSTCLNRLATAFNINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

```

FIGURA 27

(SEQ ID No. 34)

```

1      ADSRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT
61     IANEAEGGAT AVAYNKISWN PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVLV WVGANDYLAY
121    GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLENLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181    NQLLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241    STDRQLSAFS PQRERLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301    SERAATFIAN QYEFLAH*
```

FIGURA 28

(SEQ ID No. 35)

```

1      ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT
61     IANEAEGGAT AVAYNKISWN PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVLV WVGANDYLAY
121    GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLENLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181    NKLLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241    STDRQLSAFS PQRERLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301    SERAATFIET QYEFLAHG
```

FIGURA 29

(SEQ ID No. 36)

ACAGGCCGATGCACGGAAACCGTACCTTTCCGCAGTGAAGCGCTCTCCCCCATCGTTCGC  
 CGGGACTTCATCCGCGATTTTGGCATGAACACTTCCTTCAACGCGCGTAGCTTGCTACAA  
 GTGCGGCAGCAGACCCGCTCGTTGGAGGCTCAGTGAGATTGACCCGATCCCTGTCCGCCG  
 CATCCGTCATCGTCTTCGCCCTGCTGCTCGCGCTGCTGGGCATCAGCCCGGCCAGGCAG  
 CCGGCCCGGCTATGTGGCCCTGGGGGATTCTATTCCCTCGGGCAACGGCGCCGGAAGTT  
 ACATCGATTCCGAGCGGTGACTGTCAACGAGCAACAACGCGTACCCCGCCCGCTGGGCGG  
 CGGCCAACGCACCGTCTCCTTACCTTCGCGGCTGCTCGGGAGCGGTGACCACGGATG  
 TGATCAACAATCAGCTGGGCGCCCTCAACGCGTCCACCGCCCTGGTGAGCATCACCATCG  
 GCGCAATGACGCGGGCTTCGCGGACGCGATGACCACCTGCGTCAACAGCTCSGACAGCA  
 CCTGCCTCAACCGGCTGGCCACCGCCACCAACTACATCAACACCACCCTGCTCGCCCGGC  
 TCGACGCGGTCTACAGCCAGATCAAGGCCCGTGCCCCAACGCCCGGTGGTCTCCTCG  
 GCTACCCGCGCATGTACCTGGCCTCGAACCCCTGGTACTGCCTGGGCTGAGCAACACCA  
 AGCGCGCGGCCATCAACACCACCGCCGACACCCTCAACTCGGTGATCTCCTCCCGGCCA  
 CCGCCACGGATTCCGATTCGGCGATGTCCGCCGACCTTCAACAACCACGAACTGTTCT  
 TCGGCAACGACTGGCTGCACTCACTCACCTGCCGCTGTGGGAGTCTACCACCCACCA  
 GCACGGGCCATCAGAGCGGCTATCTGCCGCTCCTCAACGCCAACAGCTCGACCTGATCAA  
 CGCACGGCCGTGCCCGCCCGCGCTCACGCTCGGCGGGGCGCCGACGCGTTGATCA  
 GCCACAGTCCCGGTGACGGTCCCACCGTCACGCTCGAGGGTGTACGTCACGGTGGCGCC  
 GCTCCAGAAGTGAACGTGAGCAGGACCGTGGAGCCCTCCCTGACCTCGTCAAGAAGTCT  
 CGGGGTGACGCTGATCACCCCTCCCCGTAGCCGGGGGGAAGGCGGCGCGAACTCCTT  
 GTAGGACGTCAGTCTGCGGCCCGGCTTGCACCGTCCGCTGAGACCGCTTCCATGGT  
 CGCCAGCCCGTCCCCGCGGAACCTCGGTGGGGATGTCCGTGCCAAGGTGGTCCCGGTGGT  
 GTCCGAGAGCACCGGGGCTCGTACCGGATGATGTGCAGATCCAAAGAATT

FIGURA 30

(SEQ ID NO. 37):

MRLTRSLAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSNGAGSYIDSSGDCHRSN  
 NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSIITGGNDAGFADAMTT  
 CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC  
 LGLSNTKRAAINTTADTINSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE  
 SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

## FIGURA 31

## SEQ ID No. 38

```
1 mlphpagerg evgaffallv gtpqdrllrl echetrplrg rcgcgerrvp pltlpgdgv1
61 cttstrdae twrkhqlqpr pdggfrphlg vgcllagqgs pglwlcgreg crfevcrrdt
121 pglstrngd ssppfragws lppkgeisq sarktpavpr ysllrtdrpd gprgrfvgsg
181 praatrrrlf lgipalvlvt altlvlavpt gretlwrwmc eatqdwclgv pvdsrgqpae
241 dgefillspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwsana ypelvaeayd
301 faghlsflac sgqrgyamld aidevgsqld wnsphstslvt igiggnldgf stvlkctmvr
361 vplldskact dgedairkrm akfettfeel isevrtrapd arilvgypr ifpeeptgay
421 yltasnqrw lnetiqefnq qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
481 pwvngvqlrd latgvtvdrs tfhpnaaghr avgervieqi etgpgrplya tfavvagatv
541 dtlagevg
```

FIGURA 32

(SEQ ID No. 39)

```

1 ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcggc gtgggcgtcc aggtgcaggt gcaggttctt
61 caactgctcc agcaggatgc cgcctgggcc gtgcacgatg gccttgggca ggctgtggt
121 ccccgacgag tacagcacco atagcggatg gtogaacggc agcgggggta actccagttc
181 cgcgccttcc cccgcggctt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga cagggccgca
241 gcccaggtag ggcaggacga cgggtgtgctg caggctgggc atgccgtcgc gcagggcttt
301 gagcacgtca cggcggtcga agtccttacc gcogtagcgg tagccgtcca cggccagcag
361 cactttcggg togatctcgg cgaaccggtc gaggacgctg cgcacccga agtcggggga
421 acaggacgac caggtcgcac cgatcggggc gcaggcgagg aatgccggcg tcgcctcggc
481 gatgttcggc aggtaggcca cgaccgggtc gccggggccc accccgaggc tgcggagggc
541 cgcagcgcac gccggcggtc gggtcgcgag ttctccccag gtccactcgg tcaacggccg
601 gagttcggac gccgtgccga tcgccacggc tgatgggtca cggtcgcgga agatgtgctc
661 ggcgtagttg aggggtggcg cggggaacca gacggcgccg ggcatggcgt cggaggcgag
721 cactgtgtgt tacgggtgtg cggcgcgcac ccggtagtac tcccagatcg cggaccagaa
781 tccttcgagg tcggttaccg accagcgcca cagtgcctcg tagtcgggtg cgtccacacc
841 gcggtgctcc cgcacccagc ggggtgaacgc ggtgaggttg gcgcttctt tgcgtcctc
901 gtcgggactc cacaggatcg gccgtcgcgg ctgtgagtgc atgaaacgcg accccttctg
961 ggacgggtgc gatgcccgtg gccgtcgggtg cctccccctaa cgtcccccg tgacggagtg
1021 ttgtgcacca catctagcac gccggacgcg gaaaccgtat ggagaaaaa cctacaaccc
1081 cggccggacg gtgggtttcg gccacactta ggggtcgggt gcctgcttgc cgggcagggc
1141 agtcccgggg tgctgtgtgt cgggcgggag ggctgtcgtc tcgaggtgtg ccggcgggac
1201 actccggggc tcagccgtac ccgcaacggg gacagttctc ctcccctccg ggcctgatgg
1261 tccttcccc cgaaatgcgg cgagatctcc cagtcagccc ggaaaaaccc cgtgtgccc
1321 agtactctt tgcttcgaac agacaggccg gacggtccac gggggaggtt tgtgggcagc
1381 ggaccagctg cggcgaccag acgacggttg ttctcggta tcccgcctc tgtacttgtg
1441 acagcgtcga cgtgtgtctt ggctgtcccg acggggcgcg agacgctgtg gcgcatgtgg
1501 tgtgaggcca cccaggactg gtgcctgggg gtgccggtcg actcccgcg acagcctgcg
1561 gaggacggcg agtttctcgt gcttctcccg gtcaggcag cgacctggg gaactattac
1621 gcgtcggggg attcgtactc ttccgggggac ggggcccgcg actactatcc cggcaccgcg
1681 gtgaaggggg gttgctggcg gtcgctaacc gcctatcccg agctggtcgc cgaagcctac
1741 gacttcggcg gacacttctc ttctcctggcc tcagcggccc agcgcggcta gcccatgctt
1801 gacgctatcg acgaggtcgg ctgcagctg gactggaact cccctcacac gtcgctgggtg
1861 acgatcggga tcggcggcaa cgatctgggg ttctccacgg ttttgaagac ctgcatgggtg
1921 cgggtgcccg tgctggacag caaggcgtgc acggaaccag aggacgctat ccgcaacggg
1981 atggcgaaat tcgagacgac gtttgaagag ctcatcagcg aagtgcgcac ccgcgcccg
2041 taacgcccga tccttctcgt gggcctaccc cggatttttc cggaggaacc gaccggcgc
2101 tactacacgc tgaccgcgag caaccagcgg tggctcaacg aaaccattca ggagttcaac
2161 cagcagctcg ccgaggctgt ccggtccac gacgaggaga ttgccgcgtc gggcgggggtg
2221 gccagcgtgg agttcgtgga cgtctaccac gcgttggacg gccacgagat cggctcggac
2281 gagccgtggg tgaacggggt gcagttgcgg gacctcgcca cccgggtgac tgtggaccgc
2341 agtaccttcc accccaacgc cgtggggcac cggcgggtcg gtgagcgggt catcgagcag
2401 atcgaaaccg gcccgggccg tcgcctctat gccacttctc cgggtgtggtc gggggcgacc
2461 gtggacactc tcgcgggcga ggtgggggtga cccggcttac cgtccggccc gcaggtctgc
2521 gagcaactgc gcgatctggt ccaactgcca gtgcagttcg tcttcgggtg taccagcgg
2581 cggggagagc cggatcgttg agccgtgcgt gctcttgacg agcacacccc gctgcaggag
2641 ccgttcgcac agttctcttc cgggtgcccag agtcgggtcg acgtcgatcc cagcccacag
2701 gccgatgctg cgggcccgga ccacgcccgt gccgaccagt tggtcgagge gggcgcgag
2761 cacggggggc agggcgcgga catggtccag gtaagggccg tcgcgagca ggctaccac
2821 ggagtgccg accgcgcagg cgaggcgtt gccgccaag gtgctgcctg gctggccggg
2881 gccgatcacg tcgaagactt ccgctcgcgc taccgcccgc gccacgggca ggatgccgcc
2941 gccagcgcct ttgccgaaca ggtagatata gccgtcgact ccgctgtggt ccgagcccg

```

FIGURA 33

(SEQ ID No. 40)

```

1 vsgspraatr rrlflgipal vlvtaltlvt avptgretlw rmwceatqdw clgvpvdsrg
61 qpaedgefl1 lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqlcwnspht slvtigiggn dlqfstvlkt
181 cmvrvpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilv gyprifpeep
241 tgayy:ltas nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeiaas ggvgsvfvd vyhaldghei
301 gsdepwngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietgpgr plyatfavva
361 gatvd:lage vg

```

FIGURA 34

(SEQ ID No. 41)

```

1 mrttviaasa llllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyialgdsya
61 amggrdqplr gepfclrssg nypellhaev tdltcggavt gdllpqrtlg ertlpaqvda
121 ltedttlvtl siggndlgfg evagcireri agenaddcvd llgetigeql dqlppqldrv
181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpel gdvseadrw aveltgqine tvreaaerhd
241 alfvlpddad ehntscappqg rwadiqqqgt dayplhptsa gheamaaavr dalglepvqp

```

FIGURA 35

(SEQ ID No. 42)

```

1  ttctggggtg ttatgggggt gttatcggct cgtcctgggt ggatcccgcc aggtggggta
61  ttcacggggg acttttgtgt ccaacagccg agaatgagtg ccttgagcgg tgggaatgag
121  gtggggcggg ctgtgtcgcc atgagggggc ggccggctct gtggtgcccc gcgacccccg
181  gccccggtga gcggtgaatg aaatccggct gtaatcagca tcccgtgccc accccgtcgg
241  ggaggtcagc gcccgagtg tctaccgagt cggatcctct cggactcggc catgctgtcg
301  gcagcatcgc gctcccgggt cttggcgctc ctcggctggt ctgctgctg tcccgggaag
361  gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat cccggatgcc cacttcggcg
421  ccatccggca attcggggcag ctccgggtgg aagttaggtg catccgatgc gtcggtgacg
481  ccatagtggg cgaagatctc atcctgctog agggtgctca ggccactctc cggatcgata
541  tcgggggctt ccttgatggc gtccttctct aaaccgaggt gcagcttctg gcttccaat
601  ttcgcaccac ggagcgggac gaggctggaa tgacggccga agagcccgtg gtggacctca
661  acgaagtggt gtagtcccggt gtcactcatt aggaacaccg cctccaccgc acccagcttg
721  tggccggagt tgtcgtagc gctggcatcc agaagggaaa cgatctcata tttgtcggtg
781  tgcctcagaca tgatcttctt ttgctgtcgg tgtctggtac taccacggta gggctgaatg
841  caactgttat ttttctgtta ttttaggaat tggctccatc cccacaggct ggtgtgtggtc
901  aaatcgtcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtgg tgggagccct ggtcgcgggt
961  ccgtggggagg cgcctgccc cgcaggatcg tcggcatcgg cggatctggc cggtaccccg
1021  cggtaataaa aatcattctg taacctcact cacgggtggt ttaggtatc ccccccttc
1081  gtccctgaccc cgtcccggc gcgcccggag cccgcccgtt cggtagacag gggagacgtg
1141  gacaccatga ggacaacggt catcgcagca agcgcattac tccctctcgc cggatgcggc
1201  gatggggccc gggaggagac cgcctgtgca ccgcccgggt agtccctcgg gggcatccgg
1261  gaggaggggg cggaggcgtc gacaagcatc accgacgtct acatcgcctt cggggattcc
1321  tatgcccgca tgggcccggc ggatcagccg ttaccgggtg agccgttctg cctgcgctcg
1381  tcocgtaatt acccgaact cctccacgca gaggtaaccg atctcacctg coagggggcg
1441  gtgaccgggg atctgctcga acccaggaag ctaggggagc gcacgctgcc ggcgaggtg
1501  gatgcgctga cggaggacac caccctggtc accctctcca tcgggggcaa tgacctgga
1561  ttccggggagg tggcgggatg catccgggaa cggatcgcgg gggagacgc tgatgattgc
1621  gtggacctgc tgggggaaac catcggggag cagctcgatc agcttcccc gcagctggac
1681  cgcgtgcacg aggetatccg ggaccgcgcc ggggacgcgc aggttgtggt caccggttac
1741  ctgcccctcg tgtctgccgg ggaactgccc gaactggggg atgtctccga ggcggaactg
1801  cgttggggcg ttgagctgac cgggcagatc aaccgagacc tgcgcagggc gcccgaaacg
1861  cacgatgccc tctttgtcct gcccgacgat gccgatgagc acaccagttg tgacccccca
1921  cagcagcgtt gggcggatat ccagggcaa cagaccgatg cctatccgct gcacccgacc
1981  tccgcgcgcc atgaggcgat ggccgcgcc gtcggggagc cgtgggctt ggaaccggtc
2041  cagccgtagc gccggggcgc cgttgtcga cgaccaacc atgccaggct gcagtcacat
2101  ccgcacatag cgcgcgcggg cgatggagta cgcaccatag aggatgagcc cgtatgocgac
2161  gatgatgagc agcacactgc cgaagggttg ttcccggagg gtgcgcagag ccgagtccag
2221  acctgocggc tgtccggat catgggccc accggcgatg acgatcaaca ccccaggat
2281  cccgaaggcg ataccacggg cgacataacc ggctgtccg gtgatgatga tocggtccc
2341  gacctgccct gaccccgcac ccgcctcag atcctcccgg aaatcccggg tggccccctt
2401  ccagaggttg tagacaccgc ccccagtac caccagccc gcgaccacaa ccagcaccac
2461  accccagggt tgggatagga cgggtggcgt gacatcgttg gcggtctcc catcggagggt
2521  cctgcgcgcc cgggcgaagg tggaggtggt caccgcccag gagaagtaga ccatggccat
2581  gaccgcccc ttggcccttt ccttgaggtc ctgcgccgc agcagctggc tcaattgcca
2641  gagtcccagg gccgccagg cgatgacggc aaccacagg aggaactgcc caccggagc
2701  ctccgcgatg gtggccagg cacctgaatt cgaggcctca tcaccgaac cgcggatcc
2761  agtggcgatg cgcaccgca tccaccgat gaggatgtgc agtatgcca ggacaatgaa
2821  accacctctg gccagggtgg tcagcgggg gtggtcctcg gctgtgtg cagcccgtt
2881  gatcgtccgt ttgcggatc ttgtgtogcc cttatccata gctcccattg aaccgcttg
2941  aggggtgggc ggccactgtc agggcggtt gtgatctgaa ctgtgatgtt ccatcaacc

```

FIGURA 36

(SEQ ID No. 43)

```

1 mrrfrlvglf ssvlaagaa ltgaataqaa qpaaadgyva lgdsyssgvv agsyisssgd
61 ckrstkahpy lwaahspst fdftacsgar tgdvlsgqlg plssgtglvs isiggnadagf
121 admtttcvlq sessclsria taeyvdstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigyprfyk
181 lgttciglse tkrtainkas dhlnvtlaqr aaahgftfgd vrttftghel csgspwlhsv
241 nwlningesyh ptaagqsggy lplvngaa
    
```

FIGURA 37

(SEQ ID No. 44)

```

1 cccggcggcc cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcgggggt cgttttcate
61 aggcctgcca tcgcgtcggc gaccggcgcc gtgtagttag cccggacctc gtcccaggty
121 cccggcgga tctggcgggt ggtgcgggtgc gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag
181 cccatcgtca cgttctccgg ctgcgggttcg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgcctcg
241 ccgagcacct tctcggcgag gtccggcgtg gtccgcgtea ccgtgacgta ggcgccccgg
301 ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tcgcctcccg ccagcgtcgc gctcgggtcg
361 tcgtcgggg cgatccgcag cacgcgcggc cggggcgca gcagcgtggc gccggacctg
421 acgcggtcga tcttcgccgc gtgcgagtac ggctgctcac ccgtggcgaa accgcccagg
481 aacagcgggt cgacgacgta ggaaggggag tcgctgtcgt ccacgttag ccggatcggc
541 agggcttctg gcgggttcac ggacatgtcg ccatgatcgg gcaccggcc gcccggtgca
601 ccgctttcc cggcacgca cgacaggggc tttctgcgc tcttcgctcc gaacttgaac
661 gagtgtcagc ctttcttgg catggacct tccagtcaac gcgcgtagct gctaccaccg
721 ttgtggcagc aatcctgcta agggaggttc catgagacgt ttccgacttg tcggcttctc
781 gattctgctc gtctcgcgc cgggcgcgc cctcaccgg gcagcgacc ccaggcggc
841 ccaaccggcc gccgcgacg gctatgtggc cctcggcgac tctactcct ccggggtcgg
901 agcgggcagc tacatcagct cgagcggcga ctgcaagcgc agcacgaag cccatcccta
961 cctgtgggcg gcccccact cgcctccac gttcgaactc accgctgtt ccggcgcccg
1021 tacgggtgat gttctctccg gacagctcgg cccgctcagc tccggcaccg gccctcgtctc
1081 gatcagcadc ggcggcaacg acgcccgttt cgcgcgacac atgacgacct gttgctcca
1141 gtccgagagc tctgctctgt cgcggatcgc caccgcccag gcgtacgtcg actcagcgt
1201 gccggcaag ctgcagcgcg tctactcggc aatcagcgac aaggcgcga accgccacct
1261 cgtcgtcadc ggtaccgcgc gcttctacaa gctcggcacc acctgcatcg gccctgcca
1321 gaccaagcgg acggcgatca acaaggcctc cgaccacctc aacaccgtcc tcgcccagcg
1381 cgcgcgcgcc cacggcttca ccttcggcga cgtacgcacc accttcaccg gccacgagct
1441 gtgctccggc agcccctggc tgcacagcgt caactggctg aacatcggcg agtcgtacca
1501 cccaccgcg gccggccagt ccggtggcta cctgcccgtc ctcaacggcg ccgctgacc
1561 tcaggcggaa ggagaagaag aaggagcggg gggagacgag gagtgggagg ccccgcccga
1621 cggggtcccc gtcccgtct cgtctccgt cccggtcccg caagtcaccg agaacgccac
1681 cgcgtcggac gtggcccga ccgactccg cacctccag cgcacggcac tctcgaacgc
1741 gccggtgtcg tcgtgcgtcg tcaccaccac gccgtcctgy cgcgagcgt ccgcccga
1801 cgggaaggac agcgtccgcc accccggatc ggagaccgac ccgtccggcg tcaccaccg
1861 gtagccgacc tcgcgggca gcccccgcac cgtgaacgta gccgtgaacg ccggtgcccg
1921 gtctgcggc gccggacagg ccccagta gtgggtgccc gagcccacca ccgtcacctc
1981 caccgactgc gctcggggc
    
```

FIGURA 38

(SEQ ID No. 45)

```

1 mrrsritayv tslllavgca ltgaataqas paaaatgyva lgdsyssgv gagsylsssgd
61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvlanqlg tlnsstglvs ltiggndagf
121 sdvmttcvliq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk
181 lggscslagls etkrsainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icsstwlhs
241 ldilnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva
    
```

FIGURA 39

SEQ ID No. 46

```

1 ccaccgcccg gtcggcgggc agtctctctg cctcggctgc ggagaggltg gccgtgtagc
61 cgttcagcgc ggcgcgcaac gtctttctca ccgtgcgccg gtactcgttg atcaggccct
121 tgcccttgct cgacgcggcc ttgaagccgg tgcccttctt gagcgtgacg atgtagctgc
181 ccttgatcgc ggtgggggag ccggcgccga gcaccgtgcc ctoggccggg gtggcctcgg
241 cgggcagtgc ggtgaatccg ccacagaggg cgcggctcgc cacggcgggt atcggggcga
301 tcoggatctt cttgctacgc agctgtgcc aacgagggag tctctctctg ggcagcggcg
361 cgccctgggt gggcgcacgg ctgtgggggg tgccgcgctc atcacgcaca cggccctcga
421 gcgtcgtggt ccgcctcggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggtcaaggg
481 agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggccg tgagcaccoc
541 ggggcgaccc cggaaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttctctgc aacacgcgta
601 gctggtagca cggttacggc agagatcctg ctaaaggggg gttccatgag acgttcccga
661 attacggcat acgtgacctc actcctcctc gccgtcggct gcgccctcac cggggcagcg
721 acggcgagc cgtcccagc cgcgcgggcc acgggctatg tggccctcgg cgaactcgtc
781 tcgtccggte tggcgccggg cagctacctc agctccagcg gcgactgcaa ggcagttctg
841 aaggcctatc cgtacctctg gcaggccggc caticaccct cgtcgttcag tttcatggct
901 tgctcggggc ctcgtacggg tgatgtctg gccaatcagc tcggcaccct gaactcgtcc
961 accggcctgg tctccctcac catcggaggg aacgacggcg gcttctccga cgtcatgacg
1021 acctgtgtgc tccagtccga cagcgcctgc ctctcccga tcaacacggc gaaggcgtac
1081 gtcgactcca ccctgccggg ccaactcgac agcgtgtaca cggcgatcag cacgaaggcc
1141 cgtcggccc atgtggccgt gctgggctac ccccgcttct aaaaactggg cggctcctgc
1201 ctgcggggcc tctcggagac caagcgggcc gccatcaacg acgcgccga ctatctgaac
1261 agcggcatcg ccaagcgcgc cgcgaccac ggcttccact tcggcgagct caagagcacc
1321 ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagtctcga cctgctgac
1381 atcggccagt cctaccaccc gaccgggccc ggcagctccg gcggctatct gccggctatg
1441 aacagcgtgg cctgagctcc cacggcctga atttttaagg cctgaatttt taaggcgaag
1501 gtgaaccgga agcggaggcc cgtccgtcgc ggtctcctgt cgcacaggtc accgagaacg
1561 gcacggagtt ggaagtcgtg cgcaccgggt cgcgcacctc gacggcgatc tcgttcgaga
1621 tcgttccgct cgtgtcglac gtggtgacga acacctgctt ctgtcgggtc tttccggcgc
1681 tcgcgggaa ggacagcgtc ttcagcccc gatccgggac ctcccccctc ttggtcacc
1741 agcgggtact cacctcgacc ggcaccggcc ccaccgtgaa ggtcgcctgt aacgtggggc
1801 cctgggctgt gggcgccggg caggcaccgg agtagtcggt gtgcaagcgc gtgacccgta
1861 ccttcacgga ctggccggcc ggggtcgtcg taaccggccc gccaccggc cctcccgca
1921 tggagcccga gctgtggtcg cccccgcct cggcgttctc gtctcggggg gttttcgaac
    
```

FIGURA 40

SEQ ID No. 47

```

1 mgsqpraatr rrlflgipal vltaltlvtl avptgretlw rmwceatqdw clgvpvdsrg
61 qpaedgell lsvvqaatwg nyyalgsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlqfsetvkt
181 cmvrvpllds kaccdgedai rkrmakfett feelisevrt repdarilv gyprifpeep
241 tgayytltas nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeiias gcvgsvfvd vyhaldghei
301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietgpgr plyatfavva
361 gatvdtlage vg
    
```

FIGURA 41

SEQ ID No. 48

```

1      ctgcagacac cgcgcccgcc ttctcccgga tctgcatggt cggcgactcc ctcagcgaca
61      ccggcaagat gtactccaag atgcgcggct acctgccgtc ctccccgccg tactacgagg
121     gcgccttctc gaacggcccc gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga
181     cgatcgccaa cgaggccgag gggggcgcga cgcagctgc ctacaacaag atctctgga
241     accgaagta ccaggtcatt aacaacctcg actacgaggt caccagttc ttgcagaagg
301     actcgttcaa gcccgacgac ctggtcctcc tgtgggtggg cgcacaacgac tacctggcct
361     acggttgaa cacggagcag gacgccaagc gggtgccgga cgcaatctcg gacggcgcaa
421     accgcatggt cctgaaaggc gcgaagcaga tctgctgttt caacctgcc caccctggcc
481     agaaccogtc cgcocgctcc cagaaggtcg tgcagggcgt ctgcacgtg tccgctacc
541     acaacaagct gctcctcaac ctgcgccggc agctcgcccc gacgggcatg gtcaagctgt
601     tcgagatcga caagcagttc gcggagatgc tgcgcgaccc ccagaacttc ggcctgagcg
661     acgtggagaa cccgtgctac gacggcggct acgtgtgaa gccgltcgcc acccggltccg
721     tctcgaccga cggcagctg tggccttct cgcgccagga ggcctggcg atcgcctggca
781     accgctcct ggcaacaggc gtagcttgcg cgatggccc cgcctcgcc tcgcccctca
841     actgcgaggc caagatgttc tgggaccagg tccaccccac caccgtggtc cagcggccc
901     tctcggagcg cgcggcccacc ttcctcgaga cccagtaaga gttcctcgcc cactagtcta
961     gaggatcc
    
```

Figura 42

1. L131
2. S. avermitilis
3. T. fusca
4. Consensus

```

1          1                               50
1 (1) -----MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAG-----
2 (1) -----MRRSRITAYVTSLLLAVGCALTGAATAQASPA-----
3 (1) VGSGPRAATRRRLFLGIPALVLVLTALTTLVLAVPTGRETLWRMWCEATQDW
4 (1)          MRRSRFLA  ALILLTLA  AL  GAA  ARAAP

          51                               100
1 (32) -----P-AYVALGDSYSSGNGAGSYID
2 (33) -----AAATGYVALGDSYSSGVGAGSYLS
3 (51) CLGVPVDSRGQPAEDGEFLLSPVQAATWGNYYALGDSYSSGDGARDYYP
4 (51)          A A  YVALGDSYSSG GAGSY

          101                              150
1 (53) SSGD---CHRSNNAYPARWAAANAP---SSFTFAACSGAVTTDVIN----
2 (57) SSGD---CKRSSKAYPYLWQAAHSP---SSFSFMACSGARTGDVLA----
3 (101) GTAVKGGCWRSANAYPELVAEAYDFA--GHLSFLACSGQRGYAMLDAIDE
4 (101) SSGD  C RSTKAYPALWAAAHA  SSFSF  ACSGARTYDVLA

          151                              200
1 (93) --NQLGALNAST--GLVSIGGNDAGFADAMTTCVTS-----SDSTCL
2 (97) --NQLGTLNSST--GLVSLGGNDAGFSDVMTTCVLQ-----SDSACL
3 (149) VGSQLDWNSPHT--SLVTIGGGNDLGFSTVLKTCMVR-----VPLLDS
4 (151)  QL  LNS  T  LVSITGGNDAGFAD  MTTCVL          SDSACL

          201                              250
1 (133) NRLATATNYINTTLA-----RLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMY
2 (137) SRINTAKAYVDSTLPG-----QLDSVYTAISTKAPSAHVAVLGYPRFY
3 (191) KACTDQEDAIRKRMKF----ETTFEELISEVRTRAPDARILVVGYPRI
4 (201) RIA AK YI  TLPA          RLDSVYSAI  TRAP  ARVVVLGYPRIY

          251                              300
1 (176) LASNPWYCLGLSNTKRAINTTADTLNSVISSRATAH-----GF
2 (180) KLGGSCLAGLSETKRSAINDAADYLNSAIAKRAADH-----GF
3 (237) PEEPTGAYYTLTASNQRWLNETIQEFNQQLAEAVAVHDEEIAASGGVGSV
4 (251)  SG  LGLS  TKRAAINDAAD  LNSVIAKRAADH          GF

          301                              350
1 (215) RFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLP-----VWESYH
2 (218) TFGDVKSTFTGHEICSSSTWLHSLDLLN-----IGQSYH
3 (287) EFVDVYHALDGHEIGSDEPWVNGVQLRDLATG-----VTVDRSTFH
4 (301) TFGDV  TF  GHELCSA  PWLHSLTLP          V  SYH

          351                              395
1 (248) PTSTGHQSGYLPVLNANSST-----
2 (252) PTAAGQSGGYLPVMNSVA-----
3 (328) PNAAGHRAVGERVIEQIETGPGRPLYATFAVVAGATVDTLAGEVG
4 (351) PTA  GHAAGYLPVLNSI  T

```

FIGURA 43

SEQ ID No. 17, que es la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

```

MRYFAIAFLL INTISAFVLA PKKPSQDDFY TPPQGYEAQP LGSILKTRNV ENPLTNVFTF VKVQNAWQLL
VRSEDTFGNP NAIVTTHIQP FNAKKDKLVS YQTFEDSGKL DCAPSYAIQY GSDISTLTPQ GEMYYSALL
DQGYVVVTPD YEGPKSTFTV GLQSGRATLN SLRATLKSGN LTGVSSDAET LLWGYSGGSL ASGWAAAIQK
EYAPELSKNL LGAALGGFVT NITATAEAVD SGPFAGIISN ALAGIGNEYF DFKNYLLKKV SPLLSITYRL
GNTHCLLDGG IAYFGKSFES
RIIRYFPDGW DLVNQEPIKT ILQDNGLVYQ PKDLTPQIPL FIYHGTLDAI VPIVNSRKTF QQWCDWGLKS
GEYNEDLTNG HITESIVGAP AALTWILNRF NGQPPVDGCQ HNVNASNLEY PGTPQSIKNY FEALHAILG
FDLGPDVKRD KVI LGLLKL ERF AF
    
```

FIGURA 44

SEQ ID No. 18, que es la secuencia de aminoácido de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

```

MRYFAIAFLL INTISAFVLA PKKPSQDDFY TPPQGYEAQP LGSILKTRNV ENPLTNVFTF VKVQNAWQLL
VRSEDTFGNP NAIVTTHIQP FNAKKDKLVS YQTFEDSGKL DCAPSYAIQY GSDISTLTPQ GEMYYSALL
DQGYVVVTPD YEGPKSTFTV GLQSGRATLN SLRATLKSGN LTGVSSDAET LLWGYSGGSL ASGWAAAIQK
EYAPELSKNL LGAALGGFVT NITATAEAVD SGPFAGIISN ALAGIGNEYF DFKNYLLKKV SPLLSITYRL
GNTHCLLDGG IAYFGKSFES RIIRYFPDGW DLVNQEPIKT ILQDNGLVYQ PKDLTPQIPL FIYHGTLDAI
VPIVNSRKTF QQWCDWGLKS GEYNEDLTNG HITESIVGAP AALTWILNRF NGQPPVDGCQ HNVNASNLEY
PGTPQSIKNY FEALHAILG FDLGPDVKRD KVI LGLLKL ERF AFHHHH H
    
```

FIGURA 45

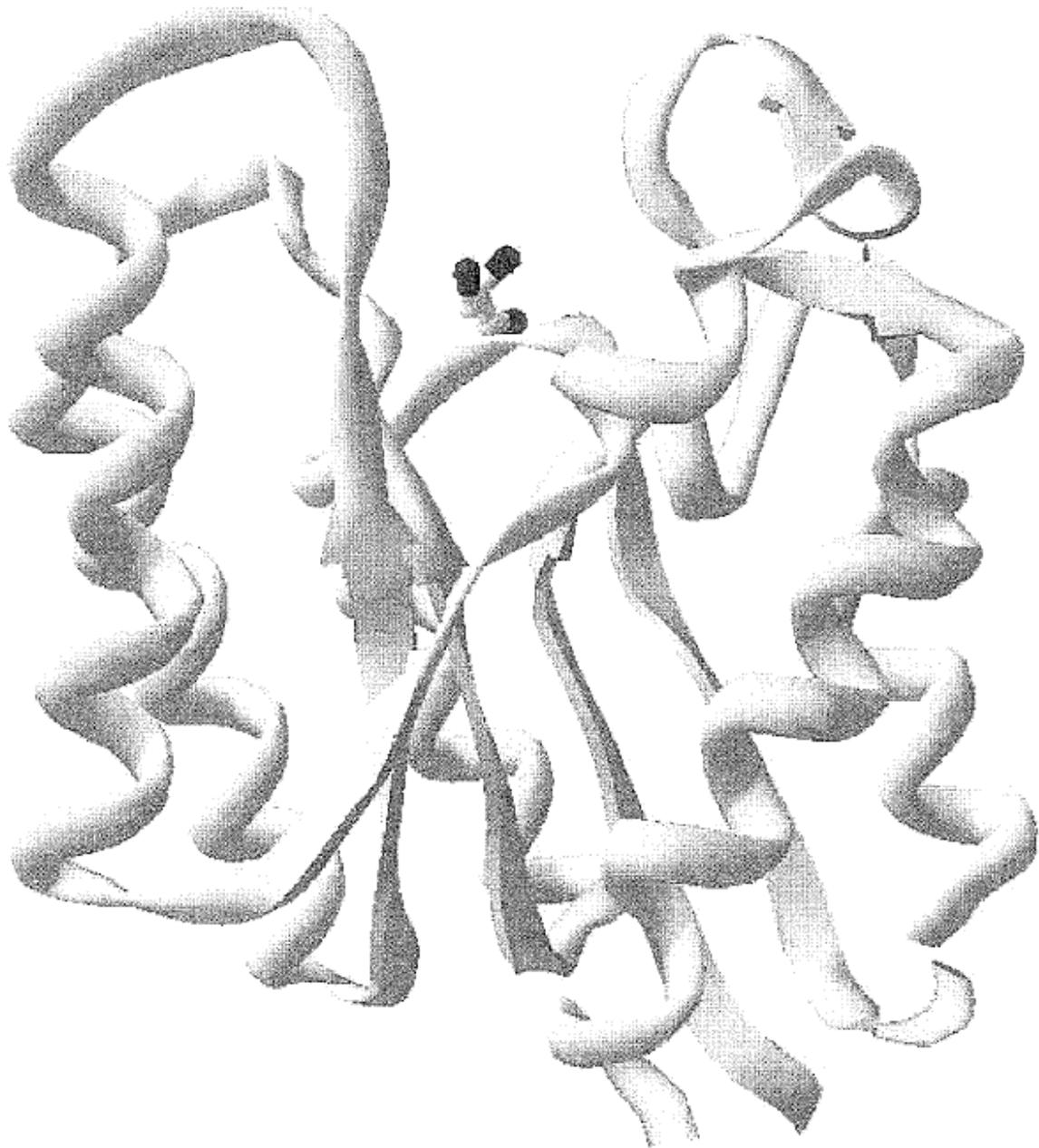


FIGURA 46

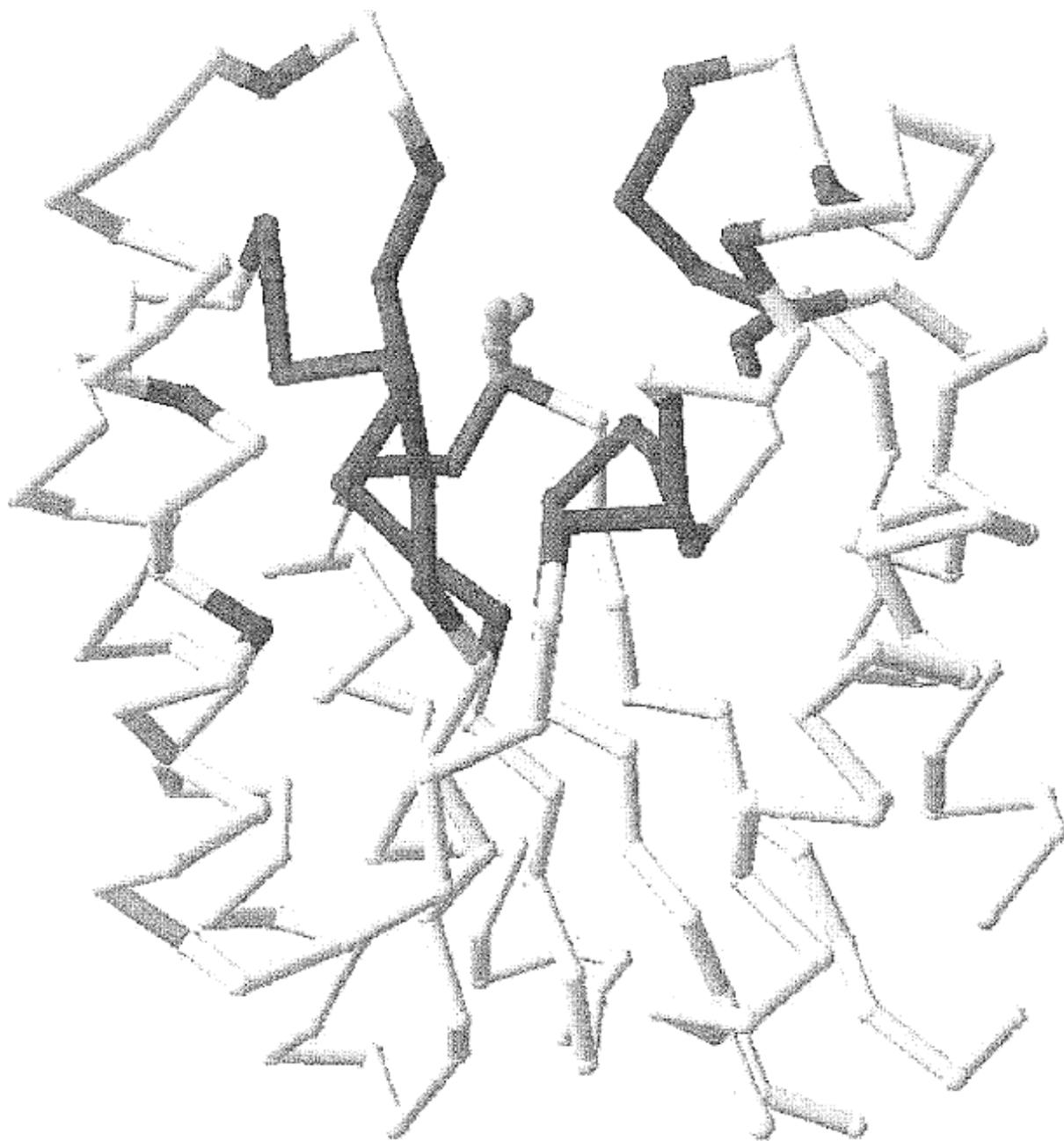
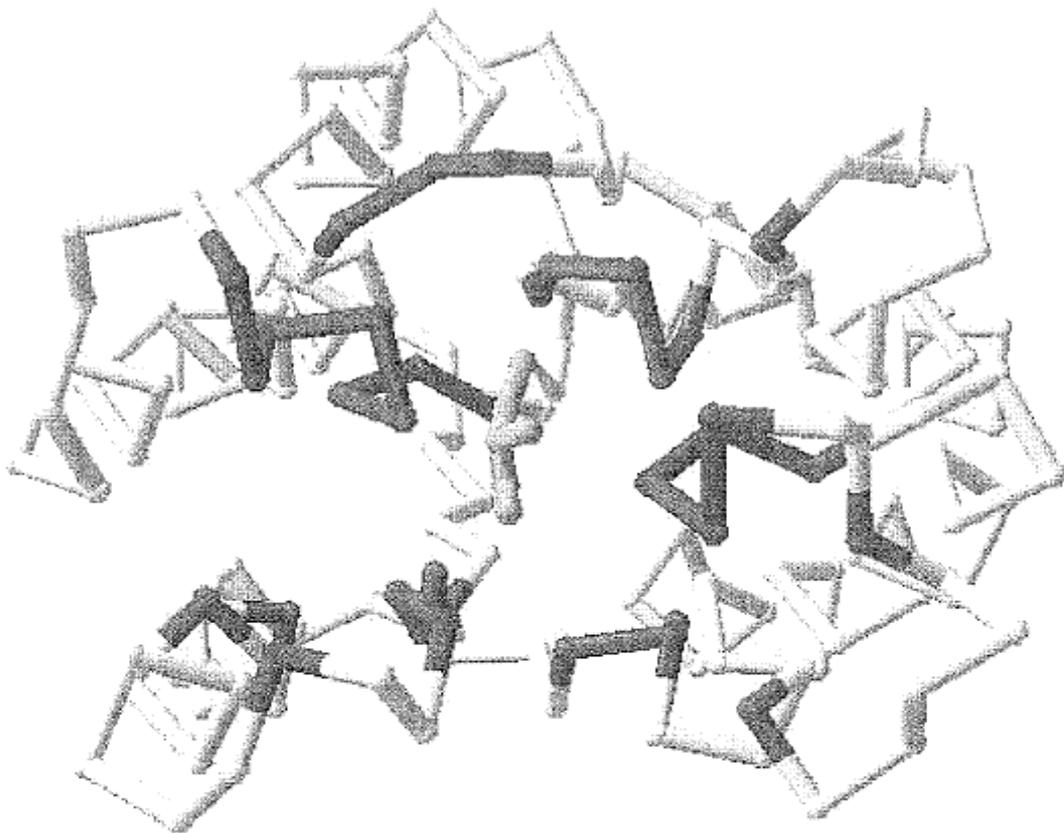


FIGURA 47











ES 2 645 041 T3

FIGURA 51

```

10      20      30      40      50
60
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
11VN_A      4 LLLIGDLSL SAG-----YRMSASA AWPALLNDKWqsk---
----- 34
P10480      28
IVMFGDSLSDTgkmyskmrgylpssppyyeGRFSNGPVWLEQLTNEFPGLTianeaeeggp 87

70      80      90      100     110
120
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
11VN_A      35 -tsvVNASISGDT-----
SQOGLARLPALLKQHQP RW 65
P10480      88 tavaYNKISWNPkyq-----
vINNLDYEV TQFLQKDSFKPDDL 125

130     140     150     160     170
180
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
11VN_A      66 VLVELGGNDG-----
LRGFQPOQTEQT 87
P10480      126 VILWVGANDY-----LA--
YGWNT EQDAKVRDA 152

190     200     210     220     230
240
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
11VN_A      88 LRQILQDVKaANAEPllmqiRLPANYGR-----
----- 115
P10480      153 ISDAANRMV-LNGAK----EILLFNL Pdlg-----
----q nP 180

250     260     270     280     290
300
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
11VN_A      116 -----RYNEAFSAIYPKLAke-----
fDVPILLPFFME 142
P10480      181 SARSQKVVEAASHV SAYHNQLLLNLArqlaptg-----
mvklfeidKQFAEMLRD 230

310     320     330     340     350
360
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
11VN_A      143 EVY LKPQW-----
----- 150
P10480      231
PQNFGLSDQRNacyggsyvwkpfasrsastdsq lsafnpqerlaiagnp llaqavaspma 290

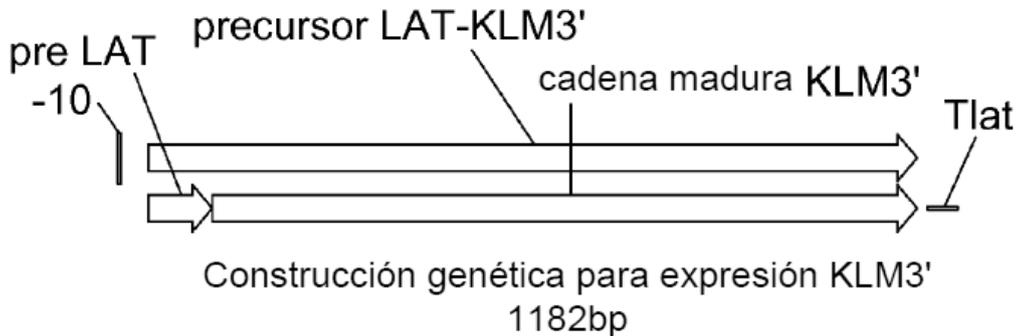
370     380     390     400
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
11VN_A      151 -----MQDDGI-----HPNRDAQPFIADWM 170
P10480      291 arsastlnc egkMFWDQV-----HPTTVVHAALSEPA 322

```

FIGURA 52

		1	50
P10480	(1)	MKHWFVCLLGLVALTVQADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
A. sal	(1)	-----ADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
A. hyd	(1)	-----ADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
Consensus	(1)	AD*RPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP	
		51	100
P10480	(51)	SSPPYYEGRFSGFVWLEQLINEFPGLTIANEAECCPTAVAYNKISWNEK	
A. sal	(33)	SSPPYYEGRFSGFVWLEQLIKQFPGLTIANEAECCATAVAYNKISWNEK	
A. hyd	(33)	SSPPYYEGRFSGFVWLEQLTKQFPGLTIANEAECCATAVAYNKISWNEK	
Consensus	(51)	SSPPYYEGRFSGFVWLEQLT**FPGLTIANEAECC*TAVAYNKISWNEK	
		101	150
P10480	(101)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTTEQDAKRVR	
A. sal	(83)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTTEQDAKRVR	
A. hyd	(83)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTTEQDAKRVR	
Consensus	(101)	YQVINNLDYEVTFQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLAYGWNTTEQDAKRVR	
		151	200
P10480	(151)	DAISDAANRMVINGAKEILLFNLPLDLCQNPFSARSQKVVEAASHVSAYHNQ	
A. sal	(133)	DAISDAANRMVINGAKQILLFNLPLDLCQNPFSARSQKVVEAVSHVSAYHNK	
A. hyd	(133)	DAISDAANRMVINGAKQILLFNLPLDLCQNPFSARSQKVVEAVSHVSAYHNQ	
Consensus	(151)	DAISDAANRMVINGAK*ILLFNLPLDLCQNPFSARSQKVVEA*SHVSAYHN*	
		201	250
P10480	(201)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDQRNACYGGSYVW	
A. sal	(183)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVW	
A. hyd	(183)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVW	
Consensus	(201)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSD**N*CY*G*YVW	
		251	300
P10480	(251)	KFFATRSVSTDRQLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASFLNCE	
A. sal	(233)	KFFATRSVSTDRQLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASFLNCE	
A. hyd	(233)	KFFATRSVSTDRQLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARRSASFLNCE	
Consensus	(251)	KFFA*RS*STD*QLSAF*PQERLAIAGNPLLAQAVASPMA*RSAS*LNCE	
		301	336
P10480	(301)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAAATFIETQYEFILAH-	
A. sal	(283)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAAATFIETQYEFILAH	
A. hyd	(283)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAAATFIETQYEFILAH-	
Consensus	(301)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSE*AAATFI**QYEFILAH*	

FIGURE 53



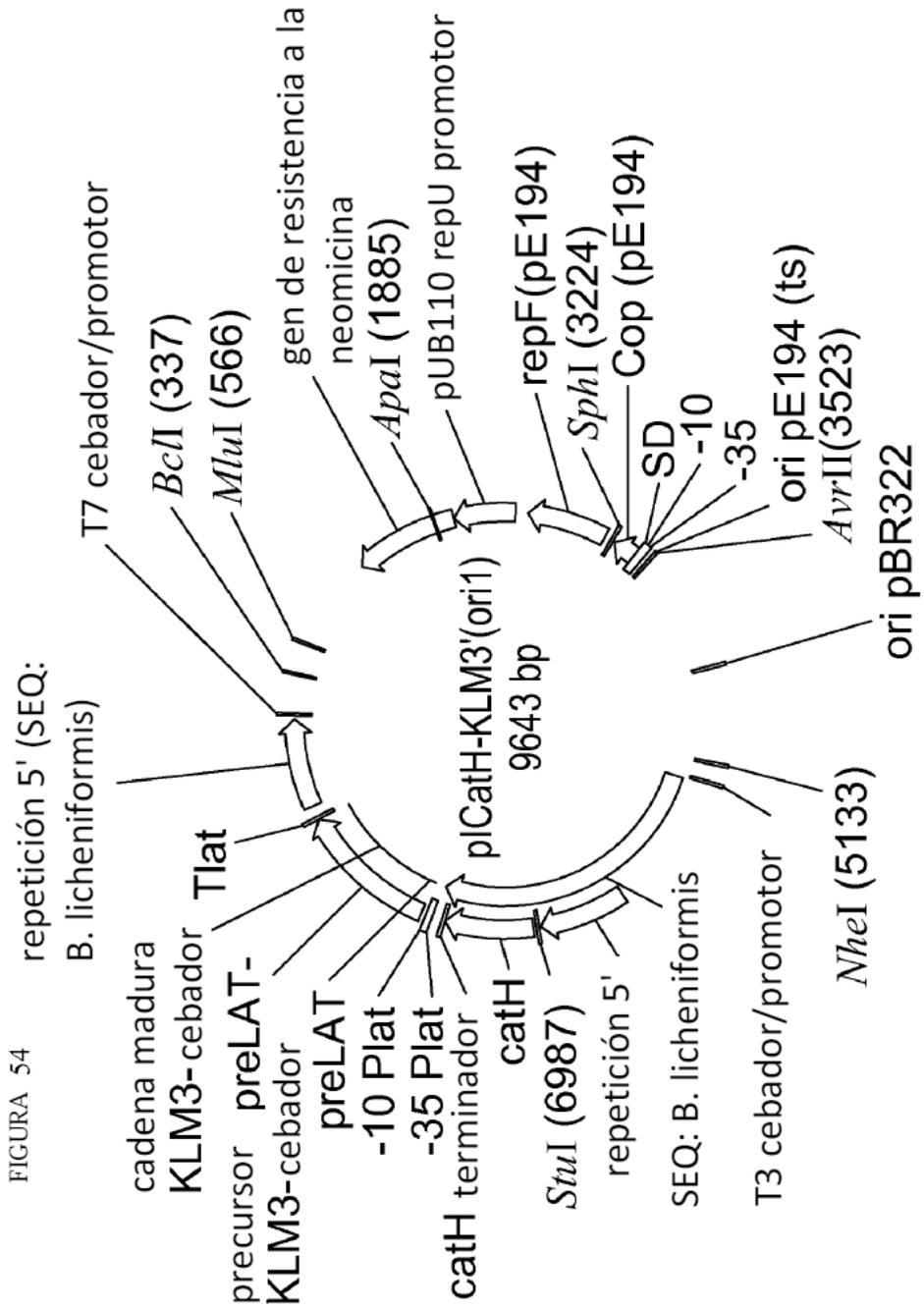


FIGURA 55

-35

```

1  GCTTTTCTTT TGGAAGAAAA TATAGGGAAA ATGGTACTTG TTAAAAATTC GGAATATTTA
CGAAAAGAAA ACCTTCTTTT ATATCCCTTT TACCATGAAC AATTTTAAAG CCTTATAAAT
-10
61  TACAATATCA TATGTTTCAC ATTGAAAGGG GAGGAGAATC ATGAAACAAC AAAAACGGCT
ATGTTATAGT ATACAAAGTG TAACTTTCCTT CTCCTCTTAG TACTTTGTTG TTTTGGCCGA
· Y A R L L T L L F A L I F L L P H S A A ·
121  TTACGCCCGA TTGCTGACGC TGTATTTGTC GTCATCTTC TTGCTGCCTC ATTCTGCAGC
AATCGGGGCT AACGACTGCG ACAATAAACG CGAGTAGAAG AACGACGGAG TAAGACGTCG
· S A A D T R P A F S R I V M F G D S L S ·
181  TTCAGCAGCA GATACAAGAC CGGCCTTAG CCGGATCGTC ATGTTTGGAG ATAGCCTGAG
AAGTCGTCTG CTATGTTCTG GCCGCAAATC GGCTTAGCAG TACAAACCTC TATCGGACTC
· D T G K M Y S K M R G Y L P S S P P Y Y ·
241  CGATACGGGC AAAATGTATA GCAAAATGAG AGGCTATCTT CCGTCAAGCC CGCCGTATTA
GCTATGCCCC TTTATCATAT CGTTTACTTC TCCGATAGAA GGCAGTTCGG GCGGCATAAT
· E G R F S N G P V W L E Q L T K Q F P G ·
301  TGAAGGCCCG TTTAGCAATG GACCGGCTG GCTGGAACAA CTGACGAAAC AATTCCGGGG
ACTTCCGGCG AAATCGTTAC CTGGCCAGAC CGACCTTGTG GACTGCTTTG TTAAGGCCCC
· L T I A N E A E G G A T A V A Y N K I S ·
361  ACTGACGATC GCTAATGAAG CAGAAGGAGG AGCAACAGCG GTCGCCATA ACAAAATCAG
TGACTGCTAG CGATTACTTC GTCTTCTCCTC TCGTTGTGCG CAGCGGATAT TGTTTTAGTC
· W D P K Y Q V I N N L D Y E V T Q F L Q ·
421  CTGGGACCCG AAATATCAGG TCATCAACAA CCTGGACTAT GAAGTCACAC AGTTTCTTCA
GACCCTGGGC TTTATAGTCC AGTAGTTGTT GGACCTGATA CTTTCAAGTG TCAAAGAAGT
· K D S F K P D D L V I L W V G A N D Y L ·
481  GAAAGACAGC TTTAAACCGG ATGATCTGCT CATCCTTTGG GTCGGCGCCA ATGATTATCT
CTTCTGTGCG AAATTTGGCC TACTAGACCA GTAGGAAACC CAGCCGCGGT TACTAATAGA
· A Y G W N T E Q D A K R V R D A I S D A ·
541  GCGGTATGGC TGGAACACAG AACAAAGATG CAAAAGAGTC AGAGATGCCA TCAGCGATGC
CCGATACCG ACCTTGTGTC TTGTTCTIACG GTTTTCTCAG TCTCTACGGT AGTCGCTACG
· A N R M V L N G A K Q I L L F N L P D L ·
601  CGCTAATAGA ATGGTCTGA ACGGCGCCAA ACAATCCTG CTGTTTAAAC TGCCGGATCT
GCGATTATCT TACCAGGACT TGCCGCGGTT TGTTTAGGAC GACAAATTGG ACGGCCTAGA
· G Q N P S A R S Q K V V E A V S H V S A ·
661  GGGACAAAAT CCGAGCGCCA GAAGCCAAA AGTCGTGCGA GCAGTCAGCC ATGTCAGCGC
CCCTGTTTTA GGCTCGCGGT CTTCGGTTTT TCAGCAGCTT CGTCAGTCGG TACAGTCGG
· Y H N K L L L N L A R Q L A P T G M V K ·
721  CTATCATAAC AAAGTCTGTC TGAACCTGGC AAGACAATTG GCACCGACGG GAATGGTTAA
GATAGTATTC TTTGACGAGC ACTTGGACCG TTCTGTTAAC CGTGGCTGCC CTTACCAATT
· L F E I D K Q F A E M L R D P Q N F G L ·
781  ATTGTTTGAA ATTGACAAAC AGTTTGCCGA AATGCTGAGA GATCCGCAA ATTTTGGCCT
TAACAAACTT TAACTGTTTG TCAAACGGCT TTACGACTCT CTAGGCGTTT TAAAACCGGA
· S D V E N P C Y D G G Y V W K P F A T R ·
841  GAGCGATGTC GAAAACCCGT GCTATGATGG CCGATATGTC TGGAAACCTT TTGCCACAAG
CTCGCTACAG CTTTGGGCA CGATACTACC GCCTATACAG ACCTTTGGCA AACGGTGTTC
· S V S T D R Q L S A F S P Q E R L A I A ·
901  AAGCGTCAGC ACGGATAGAC AACTGTCAGC GTTTAGCCCG CAAGAAAGAC TGGCAATCGC
TTCGACGTCG TGCTATCTG TTGACAGTCG CAAATCGGGC GTTCTTTCTG ACCGTTAGCG
· G N P L L A Q A V A S P M A R R S A S P ·
961  CGGAAATCCG CTTTGGCAC AAGCAGTTGC TTCACCGATG GCAAGARGAT CAGCAAGCCC
GCCTTTAGGC GAAAACCGTG TTCGTCAACG AAGTGGCTAC CGTTCTTCTA GTCGTTCCGGG
· L N C E G K M F W D Q V H P T T V V H A ·
1021 GCTGAATTGC GAAGGCAAAA TGTTTGGGA TCAGGTCCAT CCGACAACAG TTGTCCATGC
CGACTTAACG CTTCCGTTTT ACAAAACCCT AGTCCAGGTA GGCTGTTGTC AACAGGTACG
· A L S E R A A T F I E T Q Y E F L A H G ·
1081 TGCCCTTTCA GAAAGAGCGG CGACGTTTAT CGAAACACAG TATGAATTC TGGCCCATGG
ACGGGAAAGT CTTTCTCGCC GCTGCAAATA GCTTTGTGTC ATACTTAAAG ACCGGGTACC
·stop
1141 CTGAGTTAAC AGAGGACGGA TTTCTGAA GAAATCCGTT TTTTATTTT AAGCTTGGAG
GACTCAATTG TCTCCTGCCT AAAGCACTT CTTTAGGCAA AAAAAATAAA TTGCAACCTC
1201 ACAAGGTAAA GGATAAAACC TCGAG
TGTTCCATTT CCTATTTTGG AGCTC

```

FIGURA 56

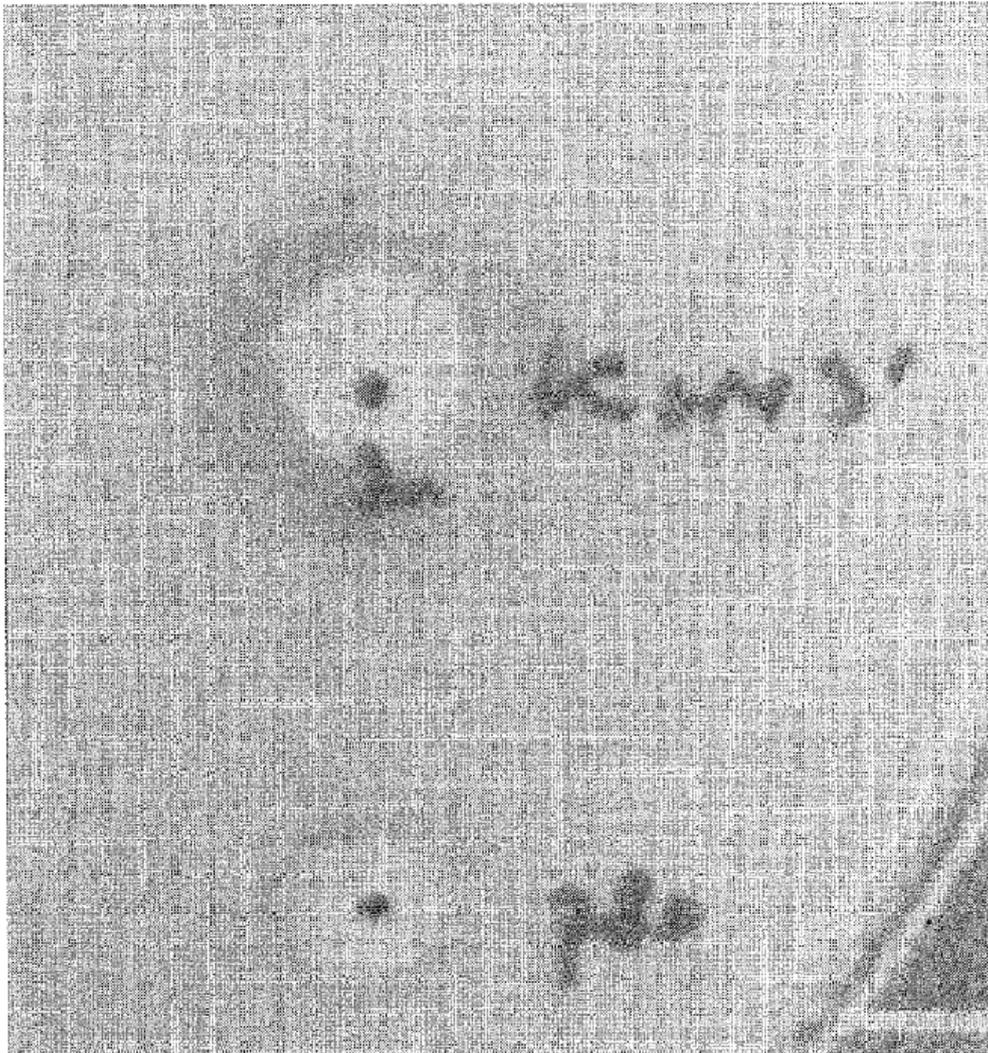


FIGURA 57 (SEQ ID No 49)

```

1   ATGAAACAAC AAAAACGGCT TTACGCCCGA TTGCTGACGC TGTATTGTC
    TACTTTGTTG TTTTTGCCGA AATGCGGGCT AACGACTGCG ACAATAAACG

51  GCTCATCTTC TTGCTGCCTC ATTCTGCAGC TTCAGCAGCA GATACAAGAC
    CGAGTAGAAG AACGACGGAG TAAGACGTCG AAGTCGTCGT CTATGTTCTG

101 CGGCGTTTAG CCGGATCGTC ATGTTTGGAG ATAGCCTGAG CGATACGGGC
    GCCGCAAATC GGCCTAGCAG TACAAACCTC TATCGGACTC GCTATGCCCG

151 AAAATGTATA GCAAAATGAG AGGCTATCTT CCGTCAAGCC CGCCGTATTA
    TTTTACATAT CGTTTTACTC TCCGATAGAA GGCAGTTCGG GCGGCATAT

201 TGAAGGCCGC TTTAGCAATG GACCGGTCTG GCTGGAACAA CTGACGAAAC
    ACTTCCGGCG AAATCGTTAC CTGGCCAGAC CGACCTTGTT GACTGCTTTG

251 AATTTCCGGG ACTGACGATC GCTAATGAAG CAGAAGGAGG AGCAACAGCG
    TTAAAGGCCG TGACTGCTAG CGATTACTTC GTCTTCTCC TCGTTGTCCG

301 GTCGCCTATA ACAAATCAG CTGGGACCCG AAATATCAGG TCATCAACAA
    CAGCGGATAT TGTTTTAGTC GACCTGGGC TTTATAGTCC AGTAGTTGTT

351 CCTGGACTAT GAAGTCACAC AGTTTCTTCA GAAAGACAGC TTTAAACCGG
    GGACCTGATA CTPCAGTGTG TCAAAGAAGT CTTTCTGTCC AAATTTGGCC

401 ATGATCTGTT CATCCTTTGG GTCGGCGCCA ATGATTATCT GCGGTATGGC
    TACTAGACCA GTAGGAAACC CAGCCGCGGT TACTAATAGA CCGCATACCG

451 TGAACACAG AACCAAGATGC CAAAAGAGTC AGAGATGCCA TCAGCGATGC
    ACCTTGTTGC TTGTTCTACG GTTTTCTCAG TCTCTACGGT AGTCGCTACG

501 CGCTAATAGA ATGGTCTTGA ACGGCGCCAA ACAAATCCTG CTGTTTAACC
    GCGATTATCT TACCAGGACT TGCCGCGGTT TGTTTAGGAC GACAAATTGG

551 TGCCGGATCT GGGACAAAAT CCGAGCGCCA GAAGCCAAAA AGTCGTGCAA
    ACGGCCTAGA CCCTGTTTTA GGCTCGCGGT CTTGCGTTTT TCAGCAGCTT

601 GCAGTCAGCC ATGTCAGCGC CTATCATAAC AACTGCTGC TGAACCTGGC
    CGTCAGTCGG TACAGTCGGC GATAGTATTG TTTGACGACG ACTTGGACCG

651 AAGACAATG GCACCGACGG GAATGGTTAA ATTTGTTGAA ATTGACAAAC
    TTCTGTTAAC CGTGGCTGCC CTTACCAATT TAACAACTT TAACTGTTTG

701 AGTTTGCCGA AATGCTGAGA GATCCGCAA ATTTTGGCCT GAGCGATGTC
    TCAAACGGCT TTACGACTCT CTAGGCGTTT TAAAACCGGA CTCGCTACAG

751 GAAAACCCGT GCTATGATGG CGGATATGTC TGGAAACCGT TTGCCACAAG
    CTTTTGGGCA CGATACTACC GCCTATACAG ACCTTTGGCA AACGGTGTTC

801 AAGCGTCAGC ACGGATAGAC AACTGTCAGC GTTTFAGCCCG CAAGAAAGAC
    TTCGCAGTCG TGCCTATCTG TTGACAGTCG CAAATCGGGC GTTCTTCTG

851 TGGCAATCGC CGGAAATCCG CTTTTGGCAC AAGCAGTTGC TTCACCGATG
    ACCGTTAGCG GCCTTTAGGC GAAAACCGTG TTCGTCAACG AAGTGGCTAC

901 GCAAGAAGAT CAGCAAGCCC GCTGAATTGC GAAGGCAAAA TGTTTGGGA
    CGTTCTCTTA GTCGTTCCGG CGACTFAACG CTTCGTTTTT ACAAACCCCT

951 TCAGGTCCAT CCGACAACAG TTGTCCATGC TGCCCTTCA GAAAGAGCGG
    AGTCCAGGTA GGCTGTTGTC AACAGGTACG ACGGGAAAGT CTTTCTCGCC

1001 CGACGTTTAT CGAAACACAG TATGAATTTT TGGCCCATGG CTGA
    CCTGCAATA GCTTTGTGTC ATACTTAAAG ACCGGGTACC GACT
    
```

FIGURA 58 (SEQ ID No. 50)

```

1  ATGAAAAAAT  GGTTCGTGTG  TTTATTGGGA  TTGGTCGCGC  TGACAGTTCA  GGCAGCCGAC
61  AGCGGTCCCG  CCTTCTCCCG  GATCGTGATG  TTTGGCGACA  GCCTCTCCGA  TACCGGCAAG
121  ATGTACAGCA  AGATGCGCGG  TTACCTCCCC  TCCAGCCCCC  CCTACTATGA  GGGCCGCTTC
181  TCCAACGGGC  CCGTCTGGCT  GGAGCAGCTG  ACCAACGAGT  TCCCGGGCCT  GACCATAGCC
241  AACGAGGGCG  AAGGCGGACC  GACCCCGCTG  GCTTACAACA  AGATCTCCTG  GAATCCCAAG
301  TATCAGGTCA  TCAACAACCT  GGACTACGAG  GTCACCCAGT  TCCTGCAAAA  AGACAGCTTC
361  AAGCCGGACG  ATCTGGTGAT  CCTCTGGGTC  GCGGCCAACG  ACTATCTGGC  CTATGGCTGG
421  AACACAGAGC  AGGATGCCAA  GCGGGTGCGC  GACGCCATCA  GCGATGCGGC  CAACCCGATG
481  GTGCTGAACG  GCGCCAAGGA  GATACTGCTG  TTCAACCTGC  CGGATCTGGG  CCAGAACCCC
541  TCGGCCCGCA  GCCAGAAGGT  GGTCGAGGCG  GCCAGCCATG  TCCTCCGCTA  CCACAACCAG
601  CTGCTGCTGA  ACCTGGCAGC  CCAGCTGGCT  CCCACCGGCA  TGGTGAAGCT  GTTCGAGATC
661  GACAAGCAGT  TTGCCGAGAT  GCTGCGTGAT  CCGCAGAACT  TCGGCCTGAG  CGACCAGAGG
721  AACGCCTGCT  ACGGTGGCAG  CTATGTATGG  AAGCCGTTTG  CCTCCCGCAG  CGCCAGCACC
781  GACAGCCAGC  TCTCCGCTT  CAACCCGCAG  GAGCGCCTCG  CCATCGCCCG  CAACCCGCTG
841  CTGGCCAGG  CCGTCGCCAG  CCCCATGGCT  GCGCGCAGCG  CCAGCACCTT  CAACTGTGAG
901  GGCAAGATGT  TCTGGGATCA  GGTCCACCCC  ACCACTGTCT  TGCACGCCGC  CCTGAGCGAG
961  CCGCCCGCCA  CCTTCATCGA  GAGCCAGTAC  GAGTTCCCTG  CCCAC

```

FIGURA 59 (SEQ ID No. 51)

```

1  ATGAAAAAAT  GGTTCGTTTG  TTTATTGGGG  TTGATCGCGC  TGACAGTTCA  GGCAGCCGAC
61  ACTCGCCCCG  CCTTCTCCCG  GATCGTGATG  TTCGGCGACA  GCCTCTCCGA  TACCGGCAAA
121  ATGTACAGCA  AGATGCGCGG  TTACCTCCCC  TCCAGCCCCC  CCTACTATGA  GGGCCGTTTC
181  TCCAACGGAC  CCGTCTGGCT  GGAGCAGCTG  ACCAAGCAGT  TCCCGGGTCT  GACCATCGCC
241  AACGAAGCGG  AAGGCGGTGC  CACTGCCCTG  GCTTACAACA  AGATCTCCTG  GAATCCCAAG
301  TATCAGGTCT  ACAACAACCT  GGACTACGAG  GTCACCCAGT  TCCTGCAAAA  AGACAGCTTC
361  AAGCCGGACG  ATCTGGTGAT  CCTCTGGGTC  GGTGCCAATG  ACTATCTGGC  ATATGGCTGG
421  AATACGGAGC  AGGATGCCAA  GCGAGTTCGC  GATGCCATCA  GCGATGCGGC  CAACCCGATG
481  GTACTGAACG  GTGCCAAGCA  GATACTGCTG  TTCAACCTGC  CGGATCTGGG  CCAGAACCCG
541  TCAGCCCGCA  GTCAGAAGGT  GGTCGAGGCG  GTCAGCCATG  TCCTCCGCTA  TCACAACCAAG
601  CTGCTGCTGA  ACCTGGCAGC  CCAGCTGGCC  CCCACCGGCA  TGGTAAAGCT  GTTCGAGATC
661  GACAAGCAAT  TTGCCGAGAT  GCTGCGTGAT  CCGCAGAACT  TCGGCCTGAG  CGACCTCGAG
721  AACCCCTGCT  ACGACGGCGG  CTATGTGTGG  AAGCCGTTTG  CCACCCGAG  CGTCAGCACC
781  GACCGCCAGC  TCTCCGCTT  CAGTCCGAG  GAACGCTCG  CCATCGCCCG  CAACCCGCTG
841  CTGGCACAGG  CCGTTGCCAG  TCCTATGGCC  CGCCGCAGCG  CCAGCCCTT  CAACTGTGAG
901  GGCAAGATGT  TCTGGGATCA  GGTACACCCG  ACCACTGTCT  TGCACGCAGC  CCTGAGCGAG
961  CCGCCCGCCA  CCTTCATCGA  GACCCAGTAC  GAGTTCCCTG  CCCACGGATG  A

```

FIGURA 60 (SEQ ID No. 52)

```

1  ATGCCGAAGC  CTGCCCTTCG  CCGTGTCTATG  ACCGCGACAG  TCGCCGCCGT  CGGCAGCCTC
61  GCCCTCGGCC  TCACCGACGC  CACCGCCAC  GCGCGCCCG  CCCAGGCCAC  TCCGACCCTG
121  GACTAGCTCG  CCCTCGGCGA  CAGCTACAGC  GCGGCTCCG  GCGTCTTCC  CGTGGACCCC
181  GCCAACCTGC  TCTGTCTCG  CTCGACGGCC  AACTACCCC  ACCTCATCGC  GGACACGAGC
241  GCGCGCCGCC  TCACGGACGT  CACCTGCGGC  GCGCGCAGA  CCGCCGACTT  CACCGGGGCC
301  CAGTACCCGG  GCGTCGCACC  CCAGTTGGAC  GCGCTCGGCA  CCGGCACGGA  CCTGGTCAGG
361  CTCACCATCG  GCGCAACGA  CAACAGCACC  TTCATCAACG  CCATCACGGC  CTGCGGCAGG
421  GCGGGTGTCC  TCAGCGGCGG  CAAGGGCAGC  CCTGCAAGG  ACAGGCACGG  CACCTCTTTC
481  GCGAGCGAGA  TCGAGGCCAA  CCGTACCCC  GCGCTCAAGG  AGGCGCTGCT  CGGGTCGCG
541  GCCAGGGCTC  CCCACGCCAG  GGTGGCGGCT  CTCGGCTACC  CGTGGATCAC  CCCGGCCACC
601  GCCGACCCGT  CTTGCTTCTT  GAAGCTCCCC  CTCGCGCCCG  GTGAGGTGCC  CTACTGCGG
661  GCCATCCAGG  CACACCTCAA  CGACGCGGTC  CCGCGGGCCG  CCGAGGAGAC  CGGAGCCACC
721  TACGTGGACT  TCTCGGGGT  GTCCGACGGC  CACGACGCTT  GCGAGGCCCC  CCGCACCCCG
781  TGGATCGAAC  CGCTGCTCTT  CGGGCACAGC  CTCGTTCCCG  TCCACCCCAA  CGCCCTGGGC
841  GAGCGGCCCA  TGGCCGAGCA  CAGGATGGAC  GTCCTCGGCC  TGGACTGA

```

FIGURA 61 (SEQ ID No. 53)

```

1 TCAGTCCAGG CCGAGGACGT CCATCGTGTG CTCGGCCATG CGCCGCTCGC CCAGGGCGTT
61 GGGGTGGACG GGAACGAGGC TGTGCCCGAA GAGCAGCCGT TCGATCCAGC GGGTGCCTGG
121 GGCCTCGCAG GCCTCGTGGC CGTCGGACAC CCCGGAGAAG TCCACGTAGG TGGCTCCGGT
181 CTCCCTCGGC GCUCCGCGGA CUGCGTUGTT GAGGTGTGCC TGGATGGCCC GCAGGTAGGG
241 CACGTACCCG GCGGCGAGGG GGAGCTTCAG GAAGCAGGAC GGGTCGGCCG TGGCCGGGGT
301 GATCCACGGG TAGCCGAGAG CCGCCACCCCT GGCCTGGGGA GCCCTGGCCG GGACGCCGAG
361 CAGCGCCTCC TTGAGCGCGG GGTACGTGTT GGCCTCGATC TCGTCGTCGA AGGAGGTGCC
421 GTGCCCTGTC TTGCAGGGGC TGCCCTTGCC GCCGCTGAGG ACACCCGCCG TGCCGCAGGC
481 CGTGATGGCC TTGATGAAGG TGCTGTGTGC GTTGCCGCCG ATGGTGAGCG TGACCAGGTC
541 CGTGCCGGTG CCGAGCGCGT CCAACTGGGG TGGACGCCC GGGTACTGGG CCCCGGTGAA
601 GTCGGCCGTC TGCOCGCGC CGCAGGTGAC GTCCGTGAGG CGGGCGCCCG TCGTGTCCGC
661 GATGACGTGG GGGTAGTTGG CCGTCGAGCG CAGACAGAGC AGGTTGGCCG GGTGACGGG
721 CAGGACGCCG GAGCCGCGCG TGTAGCTGTC GCCGAGGGCG ACGTAGTCCA GGTCCGGAGT
781 GGCCTGGGCG GGCOCGCGT GGGCGGTGGC GTCGCTGAGG CCGAGGGCGA GCGTCCGAC
841 GCGCGCGACT GTCGCGGTCA TGACACGGCG AAGGGCAGGC TTCGGCAT
    
```

FIGURA 62 (SEQ ID No. 54)

```

1 ATGGATTACG AGAAGTTTCT GTTATTTGGG GATTCCATTA CTGAATTTGC TTTAATACT
61 AGGCCCATTTG AAGATGGCAA AGATCAGTAT GCTCTTGGAG CCGCATTAGT CAACGAATAT
121 ACGAGAAAAA TGGATATTCT TCAAAGAGGG TTCAAAGGGT ACACTTCTAG ATGGGCGTGTG
181 AAAAATCTTC CTGAGATTTT AAAGCATGAA TCCAATATTTG TCATGGCCAC AATATTTTTG
241 GGTGCCAACG ATGCATGCTC AGCAGGTCCC CAAAGTGTCC CCCTCCCGA ATTTATCGAT
301 AATATTCGTC AAATGGTATC TTTGATGAAG TCTTACCATA TCCGTCCTAT TATAATAGGA
361 CCGGGGCTAG TAGATAGAGA GAAGTGGGAA AAAGAAAAAT CTGAAGAAAT AGCTCTCGGA
421 TACTTCCGTA CCAACGAGAA CTTTGCCATT TATTCCGATG CCTTAGCAAA ACTAGCCAA
481 GAGGAAAAAG TTCCCTTCGT GGCTTTGAAT AAGGCGTTTC AACAGGAAGG TGGTGATGCT
541 TGGCAACAAC TGCTAACAGA TGGACTGCAC TTTTCCGGAA AAGGGTACAA AATTTTTCAT
601 GACGAATTAT TGAAGTTCAT TGAGACATTC TACCCCAAT ATCATCCCAA AAACATGCAG
661 TACAAACTGA AAGATTGGAG AGATGTGCTA GATGATGGAT CTAACATAAT GTCTTGA
    
```

FIGURA 63 (SEQ ID No. 55)

```

atgaacctgc gtcaatggat gggcgccgcc acggctgccc ttgccttggg cttggccgcg          60
tgcgggggcy gtgggaccga ccagagcgcc aatcccaatg tegccaaggt gcagcgcgat          120
gtggtgttcg gcgacagcct gagcgatata ggcacctaca cccccgtcgc gcagggcgty          180
ggcgggcgca agttcaccac caaccgggcy cogatctggg ccgagaccgt ggcgcgcgca          240
ctgggcgtga cgctcacgcc ggcggtgatg ggctacgcca cctccgtgca gaattgcccc          300
aaggccggct gcttcgaacta tgcgcagggc ggctcgcgcg tgaccgatcc gaaccgcatc          360
ggccacaacg gggcgcgggg ggcgctgacc taccgggttc agcagcagct cgccaacttc          420
tacgcgccca gcaacaacac attcaacgcy aataacgatg togttctctg gctggccggc          480
agcaacgaca ttttctcttg gaccactgcy gcgccacca gggctcccg cgtgacgccc          540
gccattgcca cggcccaggt gcagcggcc ggcagcgacc tggctggcta tgtcaaggac          600
atgatcgcca agggtgcyac gcaggtctac gtgttcaacc tgcccagacag cagcctgacg          660
ccggacggcy tggcaagcgy cacgaccgcy caggcgctcy tgcaagcgcct ggtgggcacg          720
ttcaaacagc cgctgcaaa gggctggcc ggcacctcgg cgcgatcat cgacttcaac          780
gcacaactga ccgcygcat ccagaatgcy gctctgttcg gcttcgcca caccagcgc          840
cgggctgcy acgccacca gatcaatgcy ctggtgcca gcgcgggcy cagctcgtg          900
ttctgctcgy ccaacagcct ggtggttcc ggtgcggaac agagctacct gttcgcgac          960
ggcgtgcaac cgaccagcy cggccatcgy ctgatcgcca gcaacgtgct ggcgcgctg          1020
ctggcggata acgtcgcgca ctga                                     1044
    
```

FIGURA 64 (SEQ ID No. 56)

```

1  gtgatcgggt  cgtacgtggc  ggtgggggac  agcttcaccg  agggcgtcgg  cgacccccgc
61  cccgacgggg  cgttcgtcgg  ctgggcccac  cggctcgcgg  tactgctcgc  ggaccggcgc
121  cccgagggcg  acttcacgta  cacgaaccte  gccgtcgcgg  gcaggtcctc  cgaccagatc
181  gtggcggaac  aggtccccgg  ggtcgtcggg  ctccgcgccg  acctcgtctc  gttcgcggcg
241  ggccgcaacg  acatcatccg  gcccggaacc  gatccogaag  aggtcgcoga  cgggttcgag
301  ctggcggtgg  ccgcgctgac  cgccgcggcc  ggaaccgtcc  tggtgaccac  cgggttcgac
361  acccgggggg  tgcocgtcct  caagcacctg  cgcggcaaga  tcgccacgta  caaccggcac
421  gtccgcgcca  tgcocgaccg  ctacggctgc  ccggtcgtcg  acctgtggtc  gctgcggagc
481  gtccagggacc  gcagggcgtg  ggaacgggac  cggctgcacc  tgtcgcggga  ggggcacacc
541  cgggtggcgc  tgcgcggcgg  gcagggcctg  ggctcgcggc  tcccgccoga  cctgaccag
601  cactggccgc  cctgcgcccc  gcgcggcacg  ctccagctcc  ggccgcacga  cgtgcactgg
661  gcgcgcgagt  acctgggtgc  gtgatcggg  cgcgcgctgc  ggggcgagtc  gtcggcgcac
721  cactgacgg  ccaaggggac  gctgtcgcgg  gacgccatca  agacgcggat  cgccgcggtg
781  gctga

```

FIGURA 65 (SEQ ID No. 57)

```

1  atgcagacga  accccgcgta  caccagtctc  gtcccgctcg  ggcactcctt  caccgagggc
61  atgtcggacc  tgtgccccga  cggctcctac  cgtggctggg  ccgacctcct  cgccaccggg
121  atggcggccc  gctccccccg  ctcccggtac  gccaacctgg  cggtgccggg  gaagctgatc
181  ggacagatcg  tcgacgagca  ggtggacgtg  gccgcggcca  tgggagccga  cgtgatcacg
241  ctggtcggcg  ggctcaacga  cacgctgcgg  cccaactgcg  acatggcccg  ggtgcgggac
301  ctgctgacct  agggcgtgga  acggctcggc  ccgcaactgc  agcagctggt  gctgatgccc
361  agtcccggtc  gccagggctc  ggtgctggag  cgcttcgggc  ccgcgatgga  ggccctgttc
421  gccgtgatcg  acgacctggc  cgggcggcac  ggcccgctgg  tctcgaacct  gtaacggggc
481  cagtcgctgg  ccgacctcctg  gatgtgggac  gtggaccggc  tgcaactgac  cgccgagggc
541  caaccggcgg  tcgcggaggc  ggtgtggcag  togtcgggcc  acgagcccga  ggaccccag
601  tggcacgcgc  cgatcccggc  gacgcccggc  ccgggctggg  tgacgcgcag  gaccgcggac
661  gtccggttcg  cccggcagca  cctgctgccc  tggataggcc  gaggctgac  cgggcgctcg
721  tccggggacg  gcctgcgggc  caagcggccc  gacctgctgc  cctacgagga  ccccgcacgg
781  tga

```

FIGURA 66 (SEQ ID No. 58)

```

1  atgaccggg  gtcgtgacgg  ggggtcgggg  gcgccccca  ccaagcacgg  tgccctgctc
61  gcggcgatcg  tcaccctgat  agtggcgatc  tccgcggcca  tatacgccgg  agcgtccggc
121  gacgacggca  gcagggacca  cgcgctcgag  gccggaggcc  gtctcccacg  aggagacgcc
181  gcccccgcgt  ccaccggtgc  ctgggtgggc  gcctgggcca  ccgcaccggc  cgcggccgag
241  ccgggacacg  agacgaccgg  cctggcgggc  cgctccgtgc  gcaacgtcgt  gcacacctcg
301  gtccggcgca  ccggcgcggc  gatcacccte  tcgaacctgt  acgggcagtc  gccgtgacc
361  gtcacacacg  cctcgatcgc  cctggccggc  gggcccgaca  ccgccgcgc  gatcggcac
421  accatgcgcc  ggctcacctt  cggcggcagc  gcccggtgga  tcctcccggc  gggcgccag
481  gtgatgagcg  acaccgccc  cctcgccatc  ccctacgggg  cgaacgtcct  ggtcaccacg
541  tactccccca  tcccgtccgg  gccggtgacc  taccatccgc  agggccggca  gaccagctac
601  ctggccgacg  gcgaccgcac  gccggacgtc  accgccgtcg  cgtacaccac  ccccacgccc
661  tactggcgct  acctgaccgc  cctcgacgtg  ctgagccacg  agggccgacg  cacggtcgtg
721  gogttcggcg  actccatcac  cgaaggcgcc  cgctccgaga  gcgacgccaa  ccaccgtgg
781  accgacgtcc  tcgcccgcag  cctgcacgag  gcggcggggc  acggccggga  cacgcccgc
841  tacagcgtcg  tcaacgaggg  catcagcggc  aaccggctcc  tgaccagcag  gccggggcgg
901  ccggccgaca  acccagcggg  actgagccgg  ttccagcggg  acgtgctgga  acgcaacca
961  gtcaaggccg  tegtctgtct  cctcggcgtc  aacgacgtcc  tgaacagccc  ggaactcgcc
1021  gaccgcgacg  ccctcctgac  cggcctgcgc  acctcgtcgt  accggggcca  cgcccgggga
1081  ctgcgggtcg  tcggcgccac  gatcacggcg  ttccggcggt  acggcggcta  caccgagcc
1141  cgcgagacga  tgcggcagga  ggtcaacgag  gagatccgct  ccggccgggt  cctcgacacg
1201  gtctgtagct  tcgacaaggc  cctgcgcgac  ccgtacgacc  ccgcgggat  gcgctccgac
1261  tacgacagcg  gcgaccacct  gcaccccggc  gacaaggggt  acgcgcgat  gggcgcggtc
1321  atcgacctgg  ccgcgtgtaa  gggcgcggcg  ccggtcaagg  cgtag

```

FIGURA 67 (SEQ ID No. 59)

```

1 atgacgagca tgtcaggggc gagggtggcg cggcggatcg cggccggcgc ggcgtacggc
61 ggcggcggca tgggcctggc gggagcggcg gcggtcggtc tgggtggggc cgagggtgcag
121 ctggccagac gcagggtggg ggtgggcacg ccgacccggg tgccgaacgc gcagggactg
181 tacggcggca ccoctgccac ggccggcgac ccgcgcgtgc ggctgatgat gctggggcag
241 tccacggccg cggggcaggg cgtgcaccgg gccgggcaga ccggggggcg gctgctggcg
301 tccgggctcg cggcgggtgg ggagcggccg gtgcccgtgg ggtcggtcgc ccagccgggg
361 gcgtgctcgg acgacctgga ccggcaggtg gcgctgggtc tcgcccagcc ggaccgggtg
421 cccgacatct gcgtgatcat ggtcggcgcc aacgacgtca cccaccgat gccggcgacc
481 cgctcgggtg gccacctgtc ctccgggta cggcggctgc gcaccggccg tcggtgaggtg
541 gtggtcggca cctgtccgga cctgggcacg atcagcgggg tcgggcagcc gctgcgctgg
601 ctggcccggc gggcctcacg gcagctcggc gcggcacaga ccatcggcgc cgtcggagcag
661 ggcgggcgca cgggtgctgt gggcgacctg ctgggtccgg agttcggcca gaaccggcg
721 gagctcttcg gccccgacaa ctaccacccc tccgcccagg ggtaccgccac ggcgcgctg
781 gcggtactgc cctcgggtgt gcgcgcgtc ggctcgtggc cggccgacga ggagcaccgc
841 gacgcgctgc gccgcgaggg ctctcctgccc gtggcgcgcg cggcggcgga ggtcggctcc
901 gaggcgggta cggaggtcgc cgcgcctat cctaccgggc ctggggggcc ctggggctg
961 ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgtcg gaggcggaac cgtccagccc gtcggcggtt
1021 tga

```

FIGURA 68 (SEQ ID No. 60)

```

1 atgggtgtag ggaecgacca gcggacggcg taecggcgtc gccgggcgcg tgtcggctc
61 gccgcccctga ccgcccggc cctggggcgtg ggcgtggcgg gctgcgactc cgtggggcgg
121 gactcacccg ctccctccgg cagcccgtcg aagcggacga ggaccggccc ccctggggac
181 accagcccgg cgtccgtcgc cgcctggggc gactccatca ccgcggctt cgagcctgt
241 gcggtgctgt cggactgccc ggaggtgtcg tgggcgaccg gcagcagcgc gaaggctgac
301 tcgctggccg tacggctgct ggggaaggcg gacgcggccg agcacagctg gaactacgcg
361 gtcaccgggg ccggatgccc ggacctgacc gctcaggtga ccggggcggc gcagcgcgag
421 ccggagctgg tggcgggtgat ggcggggcgg aacgacggct gccgtccac gacctggcg
481 atgacgcccg tggcggactt ccgggcgcag ttcgaggagg ccatggccac cctgcgcaag
541 aagctcccga aggcgcaggt gtacgtgtcg agcatcccgg acctcaagcg gctctggtcc
601 cagggccgca ccaaccggct gggcaagcag gtgtggaagc tcggcctgtg ccctcgtatg
661 ctgggcgacg cggactccct ggactcggcg gcgaccctgc gccgcaacac ggtgcgagc
721 cgggtggcgg actacaacga ggtgctgcgg gaggctctcg cgaaggaccg gcggtgccc
781 agcgaacgag gcgcggtgca cgaattccgg ttcggcacgg accagttgag ccactgggac
841 tggttccacc cgagtgtgga cggccaggcc cggctggcgg agatgccta ccgcggcgtc
901 accgcgaaga atccctga

```

FIGURA 69 (SEQ ID No. 61)

```

1 ttcatacaaa cgatgtcaca acaccggcca tccgggtcat cctgatcgt gggaatgggt
61 gacaagcctt cccgtgacga aagggtcctg ctacatcaga aatgacagaa atcctgctca
121 gggagggttc atgagactgt cccgacgcgc ggccacggcg tccgcgctcc tcctcaccoc
181 ggcgctcgcg ctcttcggcg ctagcgcgcg cgtgtccgcg ccggaatcc agccaccga
241 ctacgtggcc ctccggcact cctactctc ggggtcggc gcgggcagct acgacagcag
301 cagtggtccc tgtaagcgca gcaccaagtc ctaccggcc ctgtggggcg cctcgcacac
361 cggtacggcg tcaacttca ccgcctgttc gggcggcccg acaggagagc tgtgtgccc
421 gcagctgacc ccggtcaact ccggcacoga cctggtcagc attaccatcg gccgcaacga
481 cgggggcttc gccgacacca tgaccacctg caacctccag ggcgagagcg cgtgcctggc
541 gcggtatgcc aaggcgcgcg cctacatcca gcagacgctg cccgcccagc tggaccaggt
601 ctaogacgcc atcgacagcc gggcccocgc agcccaggtc gtcgtcctgg gctaccggcg
661 ctctacaag ctggggcgca gctgcgcccgt cggctctctg gagaagtccc gcgcggccat
721 caacgcccgc gccgacgaca tcaacgcccgt caccgccaag cgcgcgcccg accacggctt
781 cgccttcggg gacgtcaaca cgaccttcgc cgggacagag ctgtgctccg gcccccctg
841 cgtgcacagc gtcacccttc ccgtggagaa ctctaccac cccacggcca acgacagtc
901 caagggttac ctgcccgtcc tgaactccgc cacctgatct cgcggctact ccgccctga
961 cgaagtccc cccccggcg gggcttcgcc gtagggtgccc gtaccggctg cgcggctgc
1021 gccgtggcc ccgcgtaag tgcgcgcgc cccggacgcg gtcgggttc

```

FIGURA 70 (SEQ ID No. 62)

```

1  ATGAAAAAAT  GGTTTGTGTG  TTTATTGGGA  TTGGTCGGCG  TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA  CCAAACACAC  AAATAACCCT  AACCAGCGCG  ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC  AGTCGCCCCG  CCTTTTCCCG  GATCGTGATG  TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG  TCAGCGGGGC  GGAAAAGGGC  CTAGCACTAC  AAGCCGCTGT

101  GCCTCTCCGA  TACCGGCAAA  ATGTACAGCA  AGATGCGCGG  TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT  ATGGCCGTTT  TACATGTGCT  TCTACGCGCC  AATGGAGGGG

151  TCCAGCCCGC  CCTACTATGA  GGGCCGTTTC  TCCAACGGAC  CCGTCTGGCT
   AGGTGCGGCG  GGATGATACT  CCCGGCAAAG  AGGTTGCCTG  GGCAGACCGA

201  GGAGCAGCTG  ACCAAACAGT  TCCCGGGTCT  GACCATCGCC  AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC  TGGTTTGTC  AAGGCCCAGA  CTGGTAGCGG  TTGCTTCGCC

251  AAGCGCGTGC  CACTGCCCGT  GCTTACAACA  AGATCTCCTG  GAATCCCAAG
   TTCCGCCACG  GTGACGGCAC  CGAATGTGTG  TCTAGAGGAC  CTTAGGGTTC

301  TATCAGGTC  TCAACAACCT  GGACTACGAG  GTCACCCAGT  TCTTGAGAAA
   ATAGTCCAGT  AGTTGTGGA  CCTGATGCTC  CAGTGGGTCA  AGAACGTCCT

351  AGACAGCTTC  AAGCCGGACG  ATCTGGTGAT  CCTCTGGGTC  GGTGCCAATG
   TCTGTGGAAG  TTCGGCCTGC  TAGACCACTA  GGAGACCCAG  CCACGGTTAC

401  ACTATCTGGC  CTATGGCTGG  AACACGGAGC  AGGATGCCAA  GCGGGTTCGC
   TGATAGACCG  GATACCGACC  TTGTGCCTCG  TCCTACGGTT  CGCCCAAGCG

451  GATGCCATCA  GCGATGCGGC  CAACCCGATG  GTACTGAACG  GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT  CGCTACGCCG  GTTGGCGTAC  CATGACTTGC  CACGGTTCGT

501  GATACTGCTG  TTCAACCTGC  CGGATCTGGG  CCAGAACCCG  TCAGCTCGCA
   CTATGACGAC  AAGTTGAGCG  GCCTAGACCC  GGTCTTGGGC  AGTCGAGCGT

551  GTCAGAAAGT  GGTCGAGGCG  GTCAGCCATG  TCTCCGCCTA  TCACAACCAG
   CAGTCTTCCA  CCAGCTCCGC  CAGTCGGTAC  AGAGGGGGAT  AGTGTGGTTC

601  CTGCTGCTGA  ACCTGGCACG  CCAGCTGGCC  CCCACCGGCA  TGGTAAAGCT
   GACGACGACT  TGGACCGTGC  GGTCGACCGG  GGTGGCCGCT  ACCATTTCGA

651  GTTCGAGATC  GACAAGCAAT  TTGCCGAGAT  GCTGCGTGAT  CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG  CTGTTGCTTA  AACGGCTCTA  CGACGCACTA  GGCCTCTTGA

701  TCGGCCTGAG  CGACGTCGAG  AACCCCTGCT  ACGACGGCGG  CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC  GCTGCAGCTC  TTGGGGACGA  TGCTGCCGCC  GATACACACC

751  AAGCCGTTTG  CCACCCGACG  CGTCAGCACC  GACCCGCAGC  TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAAC  GGTGGCCGTC  GCAGTCGTGG  CTGGCGGTCT  AGAGGCGGAA

801  CAGTCCGACG  GAACGCCTCG  CCATCGCCGG  CAACCCGCTG  CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC  CTTGCGGAGC  GGTAGCGGCC  GTTGGGCGAC  GACCGTGTCC

851  CCGTTGCCAG  TCCTATGGCC  CGCCGCAGCG  CCAGCCCCCT  CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC  AGGATACCGG  GCGGCCTCGC  GGTCCGGGGA  GTTGACACTC

901  GGCAAGATGT  TCTGGGATCA  GGTACACCCG  ACCACTGTCT  TGACCGCAGC
   CCGTTCACAC  AGACCCTAGT  CCATGTGGGC  TGGTGACAGC  ACGTGCCTGC

951  CCTGAGCGAG  CGCGCCGCCA  CCTTCATCGC  GAACCAAGTAC  GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC  GCGCGGCGGT  GGAAGTAGCG  CTTGGTCATG  CTCRAAGGAGC

1001  CCCAC TGA
      GGGTG ACT

```

FIGURA 71 (SEQ ID No. 63)

```

1  ATGAAAAAAT  GTTTGTGTTG  TTTATTTGGG  TTGATCGGCG  TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA  CCAAACAAAC  AATAAACCCC  AACTAGCGCG  ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC  ACTCGCCCG  CCTTCTCCCG  GATCGTGATG  TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG  TGAGCGGGGC  GGAAGAGGGC  CTAGCACTAC  AAGCCGCTGT

101  GCCTCTCCGA  TACCGGCAAA  ATGTACAGCA  AGATCGCGCG  TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT  ATGGCCGTTT  TACATGTCTG  TCTACGCGCC  AATGGAGGGG

151  TCCAGCCCGC  CCTACTATGA  GGGCCGTTTC  TCCAACGGAC  CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG  GGATGATACT  CCCGGCAAAG  AGGTGCGCTG  GGCAGACCGA

201  GGAGCAGCTG  ACCAAGCAGT  TCCCGGTCT  GACCATCGCC  AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC  TGGTTCGTCA  AGGGCCAGAG  CTGGTAGCGG  TTGCTTCGCG

251  AAGGCGGTGC  CACTGCGGTG  GCTTACAACA  AGATCTCCTG  GAATCCCAAG
   TTCGCCACG  GTGACGGCAC  CGAATGTTGT  TCTAGAGGAC  CTTAGGGTTC

301  TATCAGGTCA  TCAACAACCT  GGACTACGAG  GTCACCCAGT  TCTTGCAGAA
   ATAGTCCAGT  AGTTGTTGGA  CCTGATGCTC  CAGTGGGTCA  AGAACGTCTT

351  AGACAGCTTC  AAGCCGGACG  ATCTGGTGAT  CCTCTGGGTC  GGTGCCAATG
   TCTGTCAAG  TTCGGCCTGC  TAGACCACTA  GGAGACCCAG  CCACGGTTAC

401  ACTATCTGGC  ATATGGCTGG  AATACGGAGC  AGGATGCCAA  CCGAGTTCCG
   TGATAGACCG  TATACCGACC  TTATGCCTCG  TCCTACGGTT  CGCTCAAGCG

451  GATGCCATCA  GCGATGCGGC  CAACCGCATG  GTACTGAACG  GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT  CGCTACGCCG  GTTGGCGTAC  CATGACTTGC  CACGGTTCGT

501  GATACTGCTG  TTCAACCTGC  CGGATCTGGG  CCAGAACCCG  TCAGCCCGCA
   CTATGACGAC  AAGTTGGACG  GCCTAGACCC  GGTCTTGGGC  AGTCGGGCGT

551  GTCAGAAGGT  GGTCCGAGCG  GTCAGCCATG  TCTCCGCCTA  TCACAACAAG
   CAGTCTTCCA  CCAGCTCCGC  CAGTCGGTAC  AGAGCGGGAT  AGTGTGTTC

601  CTGCTGCTGA  ACCTGGCAGC  CCAGCTGGCC  CCCACCGGCA  TGGTAAAGCT
   GACGACGACT  TGGACCGTGC  GGTGACCCGG  GGGTGGCGGT  ACCATTTCA

651  GTTCGAGATC  GACAAGCAAT  TTGCCGAGAT  GCTGCGTGAT  CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG  CTGTTGTTA  AACGGCTCTA  CGACGCACTA  GGGCTCTTGA

701  TCGGCCTGAG  CGACGTCGAG  AACCCCTGCT  ACGACGGCGG  CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC  GCTGCAGCTC  TTGGGGACGA  TGCTGCCGCC  GATACACACC

751  AAGCCGTTTG  CCACCCGAG  CFTCAGCACC  GACCCGAGC  TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAAC  GGTGGGCGTC  GCAGTCGTGG  CTGGCGGTCC  AGAGGCGGAA

801  CAGTCCGAG  GAACGCCTCG  CCATCGCCGG  CAACCCGCTG  CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC  CTTGCGGAGC  GGTAGCGGCC  GTTGGGCGAC  GACCGTGTCC

851  CCGTTGCCAG  TCCTATGGCC  CGCCGAGCG  CCAGCCCCCT  CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC  AGGATACCGG  GCGGCGTCC  GGTCCGGGGA  GTTGCACACT

901  GGCAAGATGT  TCTGGGATCA  GGTACACCCG  ACCACTGTCC  TGCAGCAGC
   CCGTTCTACA  AGACCCTAGT  CCATGTGGGC  TGGTGACAGC  ACGTCCGTCG

951  CCTGAGCGAG  CGCCCGCCA  CCTTCATCGA  GACCCAGTAC  GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC  GCGCGGCGGT  GGAAGTAGCT  CTGGGTCTAG  CTCAAGGAGC

1001  CCCACGGATG  A
      GGGTGCCCTAC  T

```

FIGURA 72 (SEQ ID No. 24)

```

1  ATGTTTAAAGT TTAAAAAGAA TTTCTTAGTT GGATTATCGG CAGCTTTAAT
   TACAAATTCA AATTTTTTCTT AAAGAATCAA CCTAATAGCC GTCGAAATTA
51  GAGTATTAGC TTGTTTTTCGG CAACCGCCTC TGCAGCTAGC GCCGACAGCC
   CTCATAATCG AACAAAAGCC GTTGGCGGAG ACGTCGATCG CGGCTGTCCG
101  GTCCCGCCTT TTCCCGGATC GTGATGTTCC GCGACAGCCT CTCCGATACC
   CAGGGCGGAA AAGGGCCTAG CACTACAAGC CGCTGTCCGA GAGGCTATGG
151  GGCAAAATGT ACAGCAAGAT GCGCGGTAC CTCCCCTCCA GCCCGCCCTA
   CCGTTTTACA TGTCGTCTA CGCCCAATG GAGGGGAGGT CCGGCCGGAT
201  CTATGAGGGC CGTTTCTCCA ACGGACCCGT CTGGCTGGAG CAGCTGACCA
   GATACTCCCG GCAAAGAGGT TGCTGGCA GACCGACCTC GTCGACTGGT
251  AACAGTTCCC GGTCTGACC ATCGCCAACG AAGCGGAAGG CCGTGCCACT
   TTGTCAAGGG CCCAGACTGG TAGCGGTPGC TTCGCCITCC GCCACGGTGA
301  GCCGTGGCTT ACAACAAGAT CTCCTGGAAT CCCAAGTATC AGGTCATCAA
   CGGCACCGAA TGTGTCTA GAGGACCTTA GGTTTCATAG TCCAGTAGTT
351  CAACCTGGAC TACGAGGTCA CCCAGTTCTT GCAGAAAGAC AGCTCAAGC
   GTTGGACCTG ATGCTCCAGT GGGTCAAGAA CGTCTTTCG TCGAAGTTCC
401  CGGACGATCT GGTGATCCTC TGGTCCGGT CCAATGACTA TCTGGCCTAT
   GCCTGCTAGA CCACTAGGAG ACCCAGCCAC GGTACTGAT AGACCCGATA
451  GGCTGGAACA CGGAGCAGGA TGCCAAGCGG GTTCGCGATG CCATCAGCGA
   CCGACCTTGT GCCTCGTCTT ACGGTTCCGC CAAGCGCTAC GGTAGTCCGT
501  TGGCGCCAAC CGCATGGTAC TGAACGGTGC CAAGCAGATA CTGCTGTTCA
   ACGCCGGTTG GCGTACCATS ACTTGCCACG GTTCGTCTAT GACGACAAGT
551  ACCTGCCGGA TCTGGGCCAG AACCCGTCAG CTCGCAGTCA GAAGTGGTC
   TGGACGGCCT AGACCCGGTC TTGGGCAGTC GAGCGTCAGT CTTCCACCAG
601  GAGGCGGTCA GCCATGTCTC CGCCTATCAC AACCAGCTGC TGCTGAACCT
   CTCGCCAGT CGGTACAGAG GCGGATAGTG TTGGTCGACG ACGACTTGG
651  GGCACGCCAG CTGGCCCCA CCGGCATGGT AAAGCTGTTT GAGATCGACA
   CCGTGCCTG GACCCGGGGT GGCCGTACCA TTTCCGACAAG CTCTAGCTGT
701  AGCAATTTGC CGAGATGCTG CTTGATCCGC AGAAGTTCGG CCTGAGCGAC
   TCGTTAAACG GCTCTACGAC GCACTAGGCG TCTTGAAGCC GGACTCGCTG
751  GTCGAGAACC CCTGCTACGA CGGCGGCTAT GTGTGGAAGC CGTTTGCCAC
   CAGCTCTTGG GGACGATGCT GCGGCCGATA CACACCTTCG GCAAACGGTG
801  CCGCAGCGTC AGCACCGACC GCCAGCTCTC CGCCTTCAGT CCGCAGGAAC
   GCGCTCCGAG TCGTGGCTGG CCGTCGAGAG GCGGAAGTCA GCGCTCCTTG
851  GCCTCGCCAT CGCCGGCAAC CCGCTGCTGG CACAGGCCGT TGCCAGTCCCT
   CCGAGCGGTA GCGGCCGTTG GCGCAGCACC GTGTCCGGCA ACGGTGAGGA
901  ATGGCCCCGC GCAGCGCCAG CCCCCTCAAC TGTGAGGGCA AGATGTTCTG
   TACCGGGCGG CTTCCGGGTC GGGGAGTTG AACTTCCCCT TCTACAAGAC
951  GGATCAGGTA CACCCGACCA CTGTCTGCA CCGAGCCCTG AGCGAGCGCG
   CCTAGTCCAT GTGGGCTGGT GACAGCACGT GCGTCGGGAC TCGCTCGCGC
1001  CCGCCACCTT CATCGCGAAC CAGTACGAGT TCCTCGCCCA CTGATGA
   GCGCGTGGAA GTAGCGCTTG GTCATGCTCA AGGAGCGGGT GACTACT

```

FIGURA 73

SEQ ID No. 68

```
1  ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQQFPGLT
61  IANEAECCGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLIVL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLENLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPF

236 RSASPLNCEG KMFWDQVHPT TVVHAALSER AATFIETQYE FLAHG
```

FIGURA 74

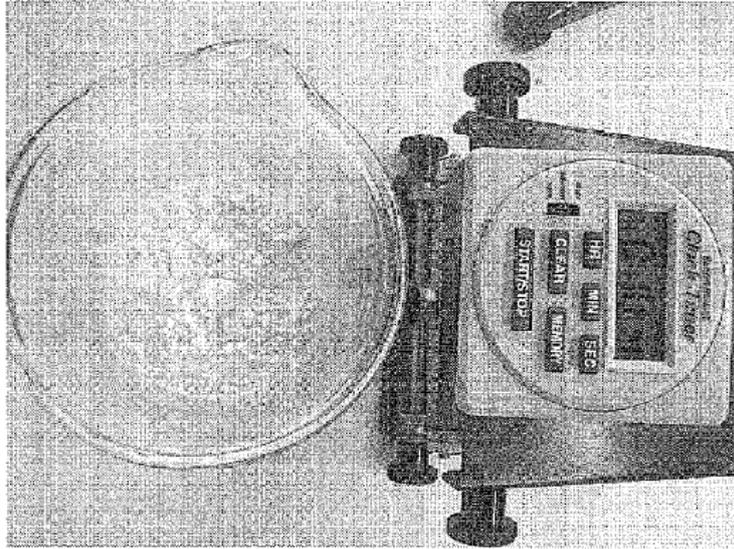


FIGURA 75

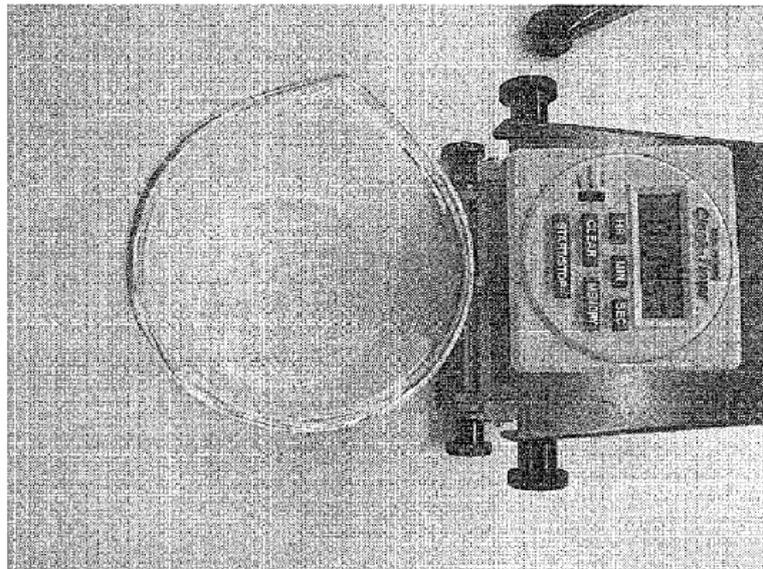
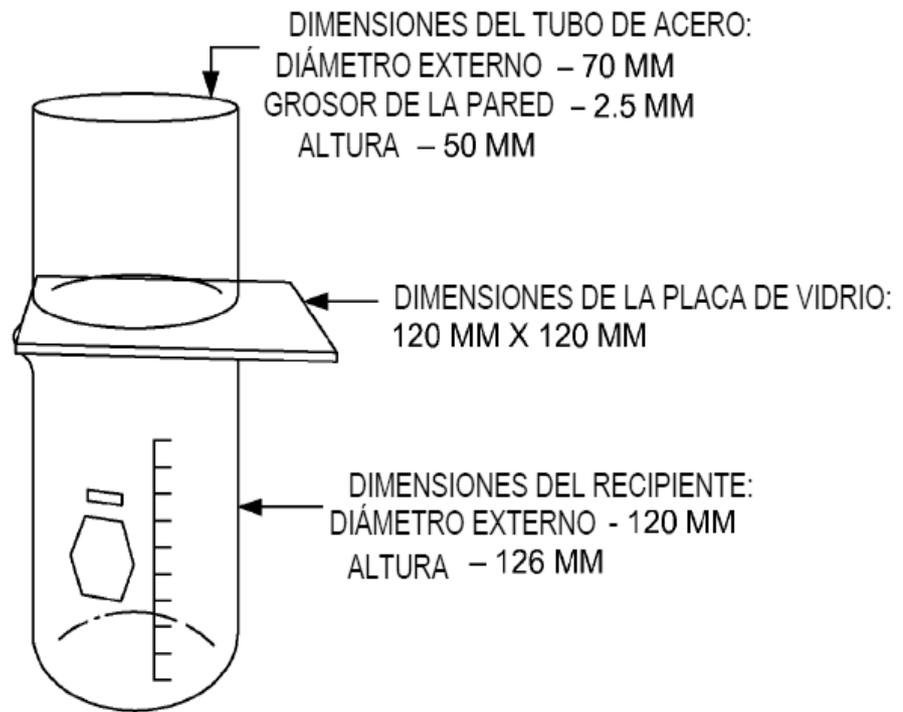


FIGURA 76



**FIGURA 77**

**SEQ ID NO. 120**

gacactgcc ccgccttctc ccggatcgtg atgttcggcg acagcctctc cgataccggc 60  
 aaaatgtaca gcaagatgcg cggttacctc cctccagcc cgccctacta tgagggccgt 120  
 ttctccaacg gacccgtctg gctggagcag ctgaccaagc agttcccggg tctgaccatc 180  
 gccaacgaag cggaaggcgg tgccactgcc gtggcttaca acaagatctc ctgggacccc 240  
 aagtatcagg tcatcaacaa cctggactac gaggtcacc cagttcttga gaaagacagc 300  
 ttcaagccgg acgatctggg gatcctctgg gtcggtgcca atgactatct ggcatatggc 360  
 tggaatacgg agcaggatgc caagcgagtt cgcgatgcca tcagcgatgc ggccaaccgc 420  
 atggtactga acggtgcca gacagatactg ctgttcaacc tgccggatct gggccagaac 480  
 ccgtcagccc gcagtcagaa ggtggctcag gcggtcagcc atgtctccgc ctatcacaac 540  
 aagctgctgc tgaacctggc acgccagctg gccccaccg gcatggtaaa gctgttcgag 600  
 atcgacaagc aatttgccga gatgctgcgt gatccgcaga acttcggcct gagcgacgtc 660  
 gagaacccct gctacgacgg cggctatgtg tggaagccgt ttgccaccg cagcgtcagc 720  
 accgaccgcc agctctccgc cttcagtcgg caggaacgcc tcgccatcgc cggcaacccg 780  
 ctgctggcac aggccgttgc cagtctatg gcccgccgca gcccagccc cctcaactgt 840  
 gagggcaaga tttctggga tcaggtacac ccgaccactg tcgtgcacgc agccctgagc 900  
 gagcgcgccg ccaccttcat cgagaccag tacgagttcc tcgccaccg atga 954

FIGURA 78

SEQ ID No. 121

```

1  ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT
61 IANEAEAGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LFNLPDLGQ NPSARSQKV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPF

236 SASPLNCEG KMFWDQVHPT TVVHAALSER AATFIETQYE FLAAG

```

FIGURA 79

SEQ ID No. 122

```

1  ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT
61 IANEAEAGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LFNLPDLGQ NPSARSQKV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPF

236 ASPLNCEG KMFWDQVHPT TVVHAALSER AATFIETQYE FLAAG

```

FIGURA 80

SEQ ID No. 123

```

1  ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT
61 IANEAEAGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LFNLPDLGQ NPSARSQKV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPF

236 SPLNCEG KMFWDQVHPT TVVHAALSER AATFIETQYE FLAAG

```