

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 444**

51 Int. Cl.:

C12N 9/38

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/EP2013/061819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13727611 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2859098**

54 Título: **Polipéptidos que tienen actividad transgalactosilante**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657180 P
08.06.2012 EP 12171335

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LARSEN, MORTEN, KROG y
CRAMER, JACOB FLYVHOLM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 650 444 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

Polipéptidos que tienen actividad transgalactosilante

Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos, específicamente polipéptidos que tienen actividad transgalactosilante y a ácidos nucleicos que codifican a éstos, y sus usos en, p. ej. , productos lácteos.

Antecedentes de la invención

Los galactooligosacáridos (GOS) son hidratos de carbono que no son digeribles por seres humanos y animales que comprenden dos o más moléculas de galactosa, generalmente hasta nueve, unidas por enlaces glucosídicos. Los GOS también pueden incluir una o más moléculas de glucosa. Uno de los efectos beneficiosos de los GOS es su capacidad para actuar como compuestos prebióticos estimulando selectivamente la proliferación de microorganismos del colon beneficiosos tales como bacterias para dar beneficios fisiológicos al consumidor. Los efectos sanitarios demostrados han dado lugar a un creciente interés en los GOS como ingredientes alimentarios para diversos tipos de alimentos.

La enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) normalmente hidroliza la lactosa a los monosacáridos D-glucosa y D-galactosa. En la reacción enzimática normal de las β -galactosidasas, la enzima hidroliza la lactosa y se une temporalmente al monosacárido galactosa en un complejo galactosa-enzima que transfiere galactosa al grupo hidroxilo del agua, dando como resultado la liberación de D-galactosa y D-glucosa. Sin embargo, a altas concentraciones de lactosa algunas β -galactosidasas son capaces de transferir galactosa a los grupos hidroxilo de D-galactosa o D-glucosa en un proceso denominado transgalactosilación, mediante el cual se producen galactooligosacáridos. Además a altas concentraciones de lactosa algunas β -galactosidasas son capaces de transferir galactosa a los grupos hidroxilo de lactosa o de oligosacáridos de orden superior.

El género *Bifidobacterium* es uno de los tipos más generalmente empleados de cultivos bacterianos en la industria láctea para fermentar una variedad de productos lácteos. La ingestión de productos que contienen *Bifidobacterium* tiene además un efecto que fomenta la salud. Este efecto no sólo se consigue mediante una reducción del pH del contenido intestinal, sino también por la capacidad de *Bifidobacterium* para repoblar la flora intestinal con individuos que han tenido su flora intestinal alterada, por ejemplo, por el consumo de antibióticos. *Bifidobacterium* además tiene el potencial de desbancar posibles microorganismos intestinales dañinos.

Los galactooligosacáridos son conocidos por potenciar el crecimiento de *Bifidobacterium*. Este efecto se consigue probablemente a través de la capacidad única de *Bifidobacterium* de explotar galactooligosacáridos como fuente de carbono. Además, se cree que el complemento alimenticio de galactooligosacáridos tiene una serie de efectos protectores de enfermedades a largo plazo. Por ejemplo, se ha demostrado que el consumo de galactooligosacáridos es muy protector contra el desarrollo de cáncer colorrectal en ratas. Hay por lo tanto un gran interés en el desarrollo de métodos baratos y eficientes para producir galactooligosacáridos para empleo en la industria para mejorar complementos alimenticios y productos lácteos.

Se ha descrito una lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215 truncada con aproximadamente 580 aminoácidos (BIF3-d3) como una enzima transgalactosilante en una solución que contiene lactosa disuelta en agua (Jørgensen *et al.*, 2001), *Appl. Microbiol., Biotechnol.*, 57: 647-652). El documento WO 01/90317 también describe una variante de truncamiento (OLGA347) como una enzima transgalactosilante y en el documento WO 2012/010597 se demostró que OLGA347 transfiere un resto de galactosa a D-fucosa, N-acetil-galactosamina y xilosa.

En el documento WO 2009/071539 se describe un fragmento truncado de forma distinta en comparación con BIF3-d3 que da como resultado hidrólisis eficiente y producción muy baja de GOS cuando se ensaya en leche.

Las enzimas lactasa de *Bifidobacterium bifidum* descritas anteriormente tienen el inconveniente de requerir altas concentraciones de lactosa tales como superiores al 10% (p/p) a fin de producir GOS, o un exceso elevado de otra molécula receptora para generar heterooligosacáridos. Además, se ha descrito una molécula que tiene predominantemente actividad beta-galactosilasa (hidrolasa).

Todavía hay necesidad de desarrollar enzimas que sean eficientes en la producción de GOS en aplicaciones con bajas concentraciones de sustrato de lactosa, tal como en la leche.

Compendio de la invención

Un objetivo de las realizaciones de la invención es proporcionar un polipéptido que tenga una proporción útil de transgalactosilación a actividad de hidrólisis y por lo tanto sean productores eficientes de GOS cuando se incuba con lactosa incluso a concentraciones bajas de lactosa tales como en un producto a lácteo. Otro objetivo de las realizaciones de la invención es proporcionar un método para la producción de galactooligosacáridos (GOS) *in situ* en productos lácteos. Otro objetivo de las realizaciones de la invención es proporcionar un método para desarrollar un método más económico y más eficiente para la producción de galactooligosacáridos (GOS) para su uso en la

industria. Otro objetivo de las realizaciones de la invención es proporcionar polipéptidos que sean estables frente a truncamiento adicional tal como por degradación proteolítica cuando se producen en un organismo adecuado tal como *Bacillus subtilis*, p. ej. *Bacillus subtilis*, cepa BG3594. Es todavía otro objeto de las realizaciones de la invención proporcionar polipéptidos que sean estables frente a truncamiento adicional durante el almacenamiento después de la formulación final.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que los polipéptidos descritos en la presente memoria son productores eficientes de galactooligosacáridos, por ejemplo *in situ* cuando se incuban en una composición que contiene lactosa tal como leche, en la que tienen una conversión eficiente de lactosa en GOS dando lugar a una cantidad menor de lactosa. La presencia de galactooligosacáridos en productos lácteos u otros productos comestibles tiene la ventaja de potenciar el crecimiento de cepas microbianas beneficiosas (probióticos) tales como la *Bifidobacterium sp.* que fomenta la salud en el propio producto y/o en el ser humano o animal que consume el producto.

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1 y en la que dicho polipéptido, cuando es un producto de expresión en una cepa BG3594 de *Bacillus subtilis* de una secuencia de ácido nucleico, que codifica dicho polipéptido, es el único producto de expresión de polipéptido de dicha secuencia de ácido nucleico que presenta actividad transgalactosilante.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionado del grupo que consiste en:

a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácidos, y

b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 975 restos de aminoácidos.

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionado del grupo que consiste en:

c. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 1.300 restos de aminoácidos,

d. un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos en condiciones de baja restricción con i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en las SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifica el polipéptido de las SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4, o 5; o ii) la cadena complementaria de i),

e. un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de las SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 o la secuencia de nucleótidos comprendida en las SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifican un polipéptido maduro, y

f. un polipéptido que comprende una supresión, inserción y/o sustitución conservativa de uno o más restos de aminoácidos de las SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5.

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionado del grupo que consiste en:

a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 1.300 restos de aminoácidos,

b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácidos,

c. un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos en condiciones de baja restricción con i) la secuencia de ácidos nucleicos comprendida en las SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifica el polipéptido de las SEQ ID n°: 1, 2, 4, o 5; o ii) la cadena complementaria de i),

d. un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de las SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 o la secuencia de nucleótidos comprendida en las SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifican un polipéptido maduro, y

e. un polipéptido que comprende una supresión, inserción y/o sustitución conservativa de uno o más restos de aminoácidos de las SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5.

En la presente memoria se describe un polipéptido que es un fragmento truncado en el terminal C de SEQ ID n°: 22 que tiene actividad transgalactosilante y que es estable frente a truncamiento adicional tal como por degradación proteolítica cuando se produce en un organismo adecuado tal como *Bacillus subtilis* p. ej. *Bacillus subtilis* cepa

BG3594 y/o que son estables frente a truncamiento adicional durante el almacenamiento después de la formulación final.

5 En un aspecto, se describe en la presente memoria un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácidos.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 975 restos de aminoácidos.

10 Se describe en la presente memoria un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96,5% de Identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3, en el que dicho polipéptido consta como máximo de 1.300 restos de aminoácidos.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido según la invención.

15 En un aspecto, se describe en la presente memoria un vector de expresión y/o un plásmido que comprende un nucleico como se describe en la presente memoria, o es capaz de expresar un polipéptido según la invención.

En un aspecto, se describe en la presente memoria una célula capaz de expresar un polipéptido según la invención.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para expresar un polipéptido, comprendiendo el método la obtención de una célula tal como se describe en la presente memoria y la expresión del polipéptido de la célula, y opcionalmente la purificación del polipéptido según la invención.

20 En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición que comprende un polipéptido según la invención, preferiblemente una composición alimenticia, más preferiblemente un producto lácteo.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para producir un producto alimenticio tal como un producto lácteo tratando un sustrato lácteo que comprende lactosa con un polipéptido según la invención.

25 En un aspecto, se describe en la presente memoria un galactooligosacárido o una composición de los mismos obtenidos por tratamiento de un sustrato que comprende lactosa con un polipéptido según la invención.

Leyendas en las figuras

La figura 1 muestra un mapa de plásmido para la variante BIF_1326 para expresión recombinada en *Bacillus subtilis*.

La figura 2 muestra SDS-PAGE que presenta variantes de truncado purificadas usando columna HyperQ eluida con un gradiente de NaCl.

30 La figura 3 muestra la relación de la actividad de transgalactosilación. La relación se calcula como la relación entre Abs420 con receptor presente dividido por Abs420 sin receptor presente por 100. Las variantes en o por debajo del índice 100 son variantes puramente hidrolíticas, mientras que el nivel por encima refleja la actividad transgalactosilante relativa .

35 La figura 4 muestra la eficacia de generación de galactooligosacáridos (GOS) de variantes seleccionadas en una matriz de yogur a 30°C durante 3 horas. En este ejemplo GOS es la cantidad acumulativa de oligosacáridos en y por encima de DP3.

La figura 5 muestra gel de SDS-PAGE presentando las diferentes variantes de la tabla 2 expresadas y los fragmentos de degradación detectados. El recuadro inferior muestra la ampliación e identificación de las bandas de degradación.

Listado de secuencias

SEQ ID n°: 1 (también denominada (BIF_917) en la presente memoria) es un fragmento truncado de 887 aminoácidos de la SEQ ID n°: 22.

SEQ ID n°: 2 (también denominada (BIF_995) en la presente memoria) es un fragmento truncado de 965 aminoácidos de la SEQ ID n°: 22.

45 SEQ ID n°: 3 (también denominada (BIF_1068) en la presente memoria) es un fragmento truncado de 1.038 aminoácidos de la SEQ ID n°: 22.

SEQ ID n°: 4 (también denominada (BIF_1172) en la presente memoria) es un fragmento truncado de 1.142 aminoácidos de la SEQ ID n°: 22.

SEQ ID nº: 5 (también denominada (BIF_1241) en la presente memoria) es un fragmento truncado de 1.211 aminoácidos de SEQ ID nº: 22.

SEQ ID nº: 6 (también denominada (BIF_1326) en la presente memoria) es un fragmento truncado de 1.296 aminoácidos de SEQ ID nº: 22.

5 SEQ ID nº: 7 es el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa de *Bifidobacterium bifidum*

SEQ ID nº: 8 es una secuencia de nucleótidos que codifica una lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215

SEQ ID nº: 9 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_917

SEC ID Nº: 10 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_995

10 SEQ ID nº: 11 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF 1068

SEQ ID nº: 12 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1172

SEQ ID nº: 13 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1241

SEQ ID nº: 14 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1326

SEQ ID nº: 15 es un cebador directo para la generación de las variantes de BIF anteriores

15 SEQ ID nº: 16 es un cebador inverso para BIF917

SEQ ID nº: 17 es un cebador inverso para BIF995

SEQ ID nº: 18 es un cebador inverso para BIF1068

SEQ ID nº: 19 es un cebador inverso para BIF1241

SEQ ID nº: 20 es un cebador inverso para BIF1326

20 SEQ ID nº: 21 es un cebador inverso para BIF1478

SEQ ID nº: 22 es lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215.

SEQ ID nº: 23 es la secuencia señal de lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215

Descripción detallada de la invención

Definiciones

25 De acuerdo con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Debe tenerse en cuenta que, tal como se emplean en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" incluye una pluralidad de dichos polipéptidos, y la referencia a "la formulación" incluye referencia a una o más formulaciones y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que generalmente entiende un experto en la técnica. Los siguientes términos se proporcionan a continuación.

35 "Transgalactosilasa" significa una enzima que, entre otras cosas, es capaz de transferir galactosa a los grupos hidroxilo de D-galactosa o D-glucosa, por lo que se producen galactooligosacáridos. En un aspecto, se identifica una transgalactosilasa por reacción de la enzima sobre lactosa en la que la cantidad de galactosa generada es menor que la cantidad de glucosa generada en un momento dado.

40 En el presente contexto, la expresión "actividad transgalactosilante" significa la transferencia de un resto de galactosa a una molécula distinta del agua. La actividad se puede medir como [glucosa] - [galactosa] generada en cualquier momento dado durante la reacción o por cuantificación directa del GOS generado en cualquier momento dado durante la reacción. Esta medición puede realizarse de varias maneras, tal como por un método de HPLC como se muestra en los ejemplos. Cuando se comparan las mediciones de la actividad transgalactosilante, se han realizado a una concentración inicial dada de lactosa, tal como, p. ej. , 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% (p/p).

En el presente contexto, la expresión "actividad β -galactosidasa" significa la capacidad de una enzima para hidrolizar β -galactósidos tales como por ejemplo lactosa en monosacáridos, glucosa y galactosa.

En el contexto del cálculo de la actividad transgalactosilante:actividad β -galactosidasa, la actividad β -galactosidasa se mide como [galactosa] generada en cualquier momento dado durante la reacción. Esta medición puede realizarse de varias maneras, tal como por un método de HPLC como se muestra en los ejemplos.

- 5 En el presente contexto, se calculó la expresión "relación de la actividad de transgalactosilación" usando orto-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG) de la forma siguiente: La relación se calcula como la relación entre Abs420 con el receptor presente dividido por Abs420 sin receptor por 100. Las variantes en o por debajo del índice 100 son variantes puramente hidrolíticas, mientras que el nivel anterior representa la actividad transgalactosilante relativa.

- 10 Relación de actividad de transgalactosilación = $(\text{Abs420}^{+\text{celobiosa}} / \text{Abs420}^{-\text{celobiosa}}) * 100\%$, donde $\text{Abs420}^{+\text{celobiosa}}$ es la absorbancia leída a 420 nm usando el método 3 descrito a continuación, incluida celobiosa en la reacción y $\text{Abs420}^{-\text{celobiosa}}$ es la absorbancia leída a 420 nm usando el método 3 descrito a continuación pero sin celobiosa en la reacción. La ecuación anterior sólo es válida para diluciones en las que la absorbancia esté entre 0,5 y 1,0.

- 15 En un aspecto, la actividad se mide después de 15 min. de reacción, 30 min. de reacción, 60 min. de reacción, 90 min. de reacción, 120 min. de reacción o 180 min. de reacción. De este modo, en un aspecto, como ejemplo, la actividad de transgalactosilación relativa se mide 15 minutos después de la adición de enzimas, tal como 30 minutos después de la adición de enzimas, tal como 60 minutos después de la adición de enzimas, tal como 90 minutos después de la adición de enzimas, tal como 120 minutos después de la adición de enzimas o tal como 180 minutos después de la adición de enzimas.

En el presente contexto, la expresión "relación de actividad transgalactosilante:actividad β -galactosidasa" significa $([\text{Glucosa}] - [\text{Galactosa}]) / [\text{Galactosa}]$.

- 20 En el presente contexto, el término [Glucosa] significa la concentración de glucosa en% en peso medida por HPLC.

En el presente contexto, el término [Galactosa] significa la concentración de galactosa en% en peso medida por HPLC.

- 25 En el presente contexto, la expresión "lactosa ha sido transgalactosilada" significa que una molécula de galactosa se ha unido por enlace covalente a la molécula de lactosa tal como por ejemplo unida por enlace covalente a cualquiera de los grupos hidroxilo libres en la molécula de lactosa o generada por transgalactosilación interna para ejemplo formando alolactosa.

- 30 En el presente contexto, se ensayó la evaluación del rendimiento de los polipéptidos descritos en la presente memoria en la producción de galactooligosacáridos (GOS) en un "ensayo basado en la leche" (simulador de aplicación de yogur). Se realizaron experimentos en lotes con un volumen de 100 μl en placas de MTP de 96 pocillos usando una mezcla de yogur, consistente en 98,60% (p/v) de leche baja en grasa pasteurizada fresca (Arla Mini-mælk) y 1,4% (p/v) de ingrediente de suero de leche Nutrilac YQ-5075 (Arla). Para hidratar completamente Nutrilac YQ-5075, la mezcla se dejó en agitación durante 20 horas y después se añadió fosfato Na 20 mM pH 6,5 para asegurar un pH de 6,5. Esta base de yogur se utilizó pura o con varios complementos tales como lactosa, fucosa, maltosa, xilosa o sales adicionales. Se mezclaron 90 μl del yogur con 10 μl de enzima purificada o fermento en bruto, se sellaron con cinta adhesiva y se incubaron a 43°C durante 3 horas. La reacción se detuvo con 100 μl de Na_2CO_3 al 10%. Las muestras se almacenaron a -20°C. La cuantificación de galactooligosacáridos (GOS), lactosa, glucosa y galactosa se realizó por HPLC. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un Dionex ICS 3000. Los parámetros del IC fueron los siguientes: Fase móvil: NaOH 150 mM, Caudal: Isocrático, 0,25 ml/min, Columna: Carbowax PA1, Temperatura de la columna: t.a., Volumen de inyección: 10 μl , Detector: PAD, Integración: Manual, Preparación de la muestra: dilución de 100 veces en agua Milli-Q (0,1 ml de muestra + 9,9 ml de agua) y filtración a través de filtros de jeringuilla de 0,45 μm , Cuantificación: áreas de los picos en porcentaje del área de pico del patrón. Se utilizó un jarabe de GOS (Vivinal GOS, Friesland Campina) como patrón para la cuantificación de GOS. Los resultados de esta evaluación se muestran en la figura 4, y se describe además en el ejemplo 2.

- 45 En el presente contexto, la expresión "cuyo polipéptido está liofilizado", significa que el polipéptido se ha obtenido liofilizando un líquido del polipéptido a una presión apropiada y durante un período apropiado eliminando el agua.

En el presente contexto, la expresión "cuyo polipéptido está en solución" se refiere a un polipéptido que es soluble en un disolvente sin precipitar fuera de la solución. Un disolvente con esta finalidad incluye cualquier medio en el que puede encontrarse el polipéptido, tal como un tampón acuoso o solución salina, un caldo de fermentación, o el citoplasma de un anfitrión de expresión.

- 50 En el presente contexto, el término "estabilizante" significa cualquier estabilizante para estabilizar el polipéptido, p. ej., un poliol tal como, p. ej., glicerol o propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico (p. ej., un éster de borato aromático). En un aspecto, el estabilizante es glicerol.

- 55 En el presente contexto, la expresión "sustrato de hidrato de carbono" significa un compuesto orgánico de fórmula general $\text{C}_m(\text{H}_2\text{O})_n$, es decir, que consta únicamente de carbono, hidrógeno y oxígeno, los dos últimos en la relación atómica 2: 1 tal como un disacárido.

En el presente contexto, el término "disacárido" es dos unidades de monosacárido unidas entre sí por un enlace covalente conocido como un enlace glucosídico formado mediante una reacción de deshidratación, dando como resultado la pérdida de un átomo de hidrógeno de un monosacárido y un grupo hidroxilo del otro. La fórmula de los disacáridos no modificados es $C_{12}H_{22}O_{11}$. En un aspecto, el disacárido es lactulosa, trehalosa, ramnosa, maltosa, sacarosa, lactosa, fucosa o celobiosa. En otro aspecto, el disacárido es lactosa.

El término "aislado" significa que el polipéptido está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la secuencia está naturalmente asociada en la naturaleza y tal como se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, "polipéptido aislado" tal como se emplea en la presente memoria se refiere a un polipéptido que es al menos un 30% puro, al menos un 40% puro, al menos un 60% puro, al menos un 80% puro, al menos un 90% y al menos un 95% puro, determinado por SDS-PAGE.

La expresión "polipéptido sustancialmente puro" significa en la presente memoria un preparado polipeptídico que contiene como máximo un 10%, preferiblemente como máximo un 8%, más preferiblemente como máximo un 6%, más preferiblemente como máximo un 5%, más preferiblemente como máximo un 4%, como máximo un 3%, aún más preferiblemente como máximo un 2%, lo más preferiblemente como máximo un 1%, e incluso más preferiblemente como máximo 0,5% en peso de otro material polipéptido con el que está asociado de forma natural. Por lo tanto, se prefiere que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, más preferiblemente al menos 98% puro, incluso más preferiblemente al menos 99%, más preferiblemente al menos 99,5% puro, e incluso más preferiblemente 100% puro en peso del material polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos descritos en la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que el preparado de polipéptido esté esencialmente libre de otro material de polipéptido con el que esté asociado de forma natural. Esto puede conseguirse, por ejemplo, preparando el polipéptido por medio de procedimientos biotecnológicos bien conocidos o por procedimientos clásicos de purificación. En la presente memoria, la expresión "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de las expresiones "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

El término "purificado" o "puro" significa que un componente dado está presente en un estado de alta concentración – p. ej., al menos aproximadamente 51% puro, tal como al menos 51% puro, o al menos aproximadamente 75% puro tal como al menos 75% en peso puro, o al menos aproximadamente 80% puro, tal como al menos 80% puro, o al menos aproximadamente 90% puro tal como al menos 90% puro, o al menos aproximadamente 95% puro tal como al menos 95% puro, o al menos al menos aproximadamente 98% de pureza tal como al menos 98% puro. Es conveniente que el componente sea el componente activo predominante presente en una composición.

El término "microorganismo" en relación con la presente invención incluye cualquier "microorganismo" que podría comprender una secuencia de nucleótidos según la presente invención o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria y/o productos obtenidos a partir de la misma. En el presente contexto, "microorganismo" puede incluir cualquier bacteria u hongo que sea capaz de fermentar un sustrato de leche.

La expresión "célula anfitriona" - en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o un vector de expresión como se ha descrito anteriormente y que se utiliza en la producción de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria. En un aspecto, la producción es una producción recombinada.

El término "leche", en el contexto de la presente invención, debe entenderse como la secreción láctea obtenida de cualquier mamífero, tal como vacas, ovejas, cabras, búfalos o camellos. En el presente contexto, la expresión "sustrato lácteo" significa cualquier material de leche en bruto y/o procesado o un material derivado de constituyentes de la leche. Los sustratos lácteos útiles incluyen, pero no se limitan a, soluciones/suspensiones de cualquier leche o productos lácteos que comprenden lactosa, tales como leche entera o baja en grasa, leche descremada, suero de leche, leche en polvo reconstituida, leche condensada, Leche UHT, suero de leche, suero de leche impregnado, suero ácido o crema. Preferiblemente, el sustrato lácteo es leche o una solución acuosa de leche desnatada en polvo. El sustrato lácteo puede estar más concentrado que la leche en bruto. En una realización, el sustrato lácteo tiene una proporción de proteína a lactosa de al menos 0,2, preferiblemente de al menos 0,3, al menos 0,4, al menos 0,5, al menos 0,6 o, aún más preferiblemente, al menos 0,7.

El sustrato lácteo puede homogeneizarse y/o pasteurizarse según métodos conocidos en la técnica.

"Homogeneización" tal como se utiliza en la presente memoria significa mezcla intensiva para obtener una suspensión o emulsión soluble. Puede realizarse para romper la grasa de la leche en tamaños más pequeños para que ya no se separa de la leche. Esto puede lograrse forzando la leche a alta presión a través de pequeños orificios.

"Pasteurización" tal como se emplea en la presente memoria significa reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos, en el sustrato lácteo. Preferiblemente, la pasteurización se alcanza manteniendo

una temperatura especificada durante un período de tiempo especificado. La temperatura especificada se alcanza normalmente por calentamiento. La temperatura y la duración pueden seleccionarse para matar o inactivar ciertas bacterias, tales como bacterias perjudiciales, y/o para inactivar enzimas en la leche. Una etapa de enfriamiento rápido puede seguir. Un "producto alimenticio" o "composición alimenticia" en el contexto de la presente invención puede ser cualquier alimento o producto alimentario comestible adecuado para el consumo por un animal o un ser humano.

Un "producto lácteo" en el contexto de la presente invención puede ser cualquier producto alimenticio en el que uno de los constituyentes principales es lácteo. Preferible, el componente principal es lácteo. Más preferiblemente, el constituyente principal es un sustrato lácteo que ha sido tratado con una enzima que tiene actividad transgalactosilante.

En el presente contexto, "uno de los constituyentes principales" significa un constituyente que tiene una materia seca que constituye más del 20%, preferiblemente más del 30% o más del 40% de la materia seca total del producto lácteo, mientras que "el mayor constituyente" significa un componente que tiene una materia seca que constituye más del 50%, preferiblemente más del 60% o más del 70% de la materia seca total del producto lácteo.

Por "producto lácteo fermentado" en el presente contexto debe entenderse como cualquier producto lácteo en donde cualquier tipo de fermentación forma parte del proceso de producción. Ejemplos de productos lácteos fermentados son productos como yogur, suero de leche, crema fresca, cuajada y queso fresco. Otro ejemplo de un producto lácteo fermentado es el queso. Un producto lácteo fermentado puede producirse por cualquier método conocido en la técnica.

El término "fermentación" significa la conversión de hidratos de carbono en alcoholes o ácidos a través de la acción de un microorganismo tal como un cultivo iniciador. En un aspecto, la fermentación comprende la conversión de lactosa en ácido láctico.

En el presente contexto, "microorganismo" puede incluir cualquier bacteria o hongo que sea capaz de fermentar un sustrato de leche.

En el presente contexto, la expresión "dominios Pfam" significa regiones dentro de una secuencia de proteínas que se identifican como Pfam-A o Pfam-B basadas en múltiples alineaciones de secuencias y la presencia de motivos de Markov ocultos ("The Pfam protein families database": R.D. Finn, J. Mistry, J. Tate, P. Coghill, A. Heger, E. Pollington, O.L. Gavin, P. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman Nucleic Acids Research (2010) Database Issue 38:D211-222.). Como ejemplos de dominios Pfam se pueden citar Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532).

Como se emplea en la presente memoria, "una posición correspondiente a la posición" significa que se hace una alineación como la descrita en la presente memoria entre un polipéptido de consulta determinado y el polipéptido de referencia. La posición correspondiente a una posición específica en el polipéptido de referencia se identifica entonces como el aminoácido correspondiente en la alineación con la identidad de secuencia más alta.

Una "variante" o "variantes" se refiere a polipéptidos o ácidos nucleicos. El término "variante" puede emplearse indistintamente con el término "mutante". Las variantes incluyen inserciones, sustituciones, transversiones, truncamientos y/o inversiones en uno o más lugares en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente. Las expresiones "polipéptido variante", "variante de polipéptido", "polipéptido", "variante" y "enzima variante" significan un polipéptido/proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada o se modifica comparada a la secuencia de aminoácidos seleccionada, tal como la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "enzimas de referencia", "secuencia de referencia", "polipéptido de referencia" significan enzimas y polipéptidos a partir de los cuales se basan cualquiera de los polipéptidos variantes, p. ej., SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. Un "ácido nucleico de referencia" significa una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de referencia.

Como se usa en la presente memoria, las expresiones "secuencia de referencia" y "secuencia objeto" se emplean indistintamente.

Como se emplea en la presente memoria, "secuencia de consulta" significa una secuencia extraña, que está alineada con una secuencia de referencia para ver si cae dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, dicha secuencia de consulta puede ser, por ejemplo, una secuencia de la técnica anterior o una secuencia de del tercer grupo.

Como se emplea en este documento, el término "secuencia" puede referirse a una secuencia polipeptídica o una secuencia de ácido nucleico, dependiendo del contexto.

Como se emplean en la presente memoria, las expresiones "secuencia polipeptídica" y "secuencia de aminoácidos" se emplean indistintamente.

La secuencia señal de una "variante" puede ser la misma o puede diferir de la secuencia señal del péptido señal de *Bacillus* natural o cualquier secuencia señal que segregue el polipéptido. Una variante puede expresarse como una proteína de fusión que contiene un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, la variante puede comprender un péptido señal de otra proteína o una secuencia diseñada para ayudar a la identificación o purificación de la proteína de fusión expresada, tal como una secuencia His-Tag.

Para describir las diversas variantes que se contemplan para ser abarcadas por la presente descripción, se adoptará la siguiente nomenclatura para facilitar la referencia. Cuando la sustitución incluye un número y una letra, por ejemplo, 592P, entonces se refiere a {posición según el sistema de numeración/aminoácido sustituido}. Por consiguiente, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido por prolina en la posición 592 se designa como 592P. Cuando la sustitución incluye una letra, un número y una letra, por ejemplo, D592P, entonces esto se refiere a {aminoácido/posición original según el sistema de numeración/aminoácido sustituido}.

Por consiguiente, por ejemplo, la sustitución de alanina por prolina en la posición 592 se designa como A592P.

Cuando son posibles dos o más sustituciones en una posición determinada, esto se designará mediante letras contiguas, que pueden separarse opcionalmente por barras oblicuas "/", p. ej., G303ED o G303E/D.

Las posiciones y sustituciones se enumeran con referencia, por ejemplo, a la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. Por ejemplo, se pueden encontrar posiciones equivalentes en otra secuencia alineando esta secuencia con la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 para encontrar una alineación con el mayor porcentaje de identidad y después determinar qué aminoácido se alinea para corresponder con un aminoácido de una posición específica de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. Dicha alineación y el uso de una secuencia como primera referencia es simplemente una cuestión de rutina para un experto en la materia.

Como se emplea en la presente memoria, el término "expresión" se refiere al procedimiento mediante el cual se produce un polipéptido basado en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

Tal como se emplea en la presente memoria, "polipéptido" se emplea indistintamente con la terminología "secuencia de aminoácidos", "enzima", "péptido" y/o "proteína". Tal como se emplea en la presente memoria, "secuencia nucleotídica" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una secuencia oligonucleotídica o secuencia polinucleotídica y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas. La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico, sintético o biotecnológico y puede ser bicatenaria o monocatenaria, ya sea que represente la cadena transcrita o complementaria. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencia nucleotídica" incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN.

"Homólogo" significa una entidad que tiene un determinado grado de identidad o "homología" con las secuencias de aminoácidos en cuestión y las secuencias de nucleótidos en cuestión. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos en cuestión es la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, y la secuencia de nucleótidos en cuestión preferiblemente es la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13.

Una "secuencia homóloga" incluye un polinucleótido o un polipéptido que tiene un cierto porcentaje, p. ej., 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, de identidad de secuencia con otra secuencia. El porcentaje de identidad significa que, cuando está alineado, ese porcentaje de bases o restos de aminoácidos son los mismos cuando se comparan las dos secuencias. Las secuencias de aminoácidos no son idénticas, donde un aminoácido es sustituido, suprimido o añadido en comparación con la secuencia objeto. El porcentaje de identidad de secuencia se mide generalmente con respecto a la secuencia madura de la proteína objeto, es decir, después de la eliminación de una secuencia señal, por ejemplo. Generalmente, los homólogos comprenderán los mismos restos del sitio activo que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Los homólogos también conservan actividad enzimática, aunque el homólogo puede tener diferentes propiedades enzimáticas que el natural.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "hibridación" incluye el proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria por emparejamiento de bases, así como el proceso de amplificación llevado a cabo en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ácido nucleico variante puede existir como ADN o ARN monocatenario o bicatenario, un heterodoble cadena de ARN/ADN o un copolímero de ARN/ADN. Como se emplea en la presente memoria, "copolímero" se refiere a una única cadena de ácido nucleico que comprende tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. El ácido nucleico variante puede optimizarse con codones para aumentar más la expresión.

Como se emplea en este documento, un compuesto "sintético" se produce por síntesis química o enzimática *in vitro*. Ello incluye, pero no se limita a, ácidos nucleicos variantes preparados con un uso óptimo de codones para organismos anfitriones, tal como un anfitrión de células de levadura u otros anfitriones de expresión de elección.

Como se emplea en la presente memoria, "célula transformada" incluye células, incluidas tanto las células bacterianas como fúngicas, que han sido transformadas mediante el empleo de técnicas de ADN recombinado. La transformación se produce generalmente por inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula. La secuencia nucleotídica insertada puede ser una secuencia nucleotídica heteróloga, es decir, es una secuencia que no es natural para la célula que se va a transformar, tal como una proteína de fusión.

Tal como se emplea en la presente memoria, "unido operativamente" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Por ejemplo, una secuencia reguladora unida operativamente a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de referencia.

Como se emplea en la presente memoria, el término "fragmento" se define en la presente memoria como un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos suprimidos del extremo amino y/o carboxilo en donde el fragmento tiene actividad.

En un aspecto, el término "fragmento" se define en la presente memoria como un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos suprimidos del extremo amino y/o carboxilo del polipéptido de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5; en donde el fragmento tiene actividad transgalactosilante.

La expresión "similar al dominio de unión a la galactosa" tal como se emplea en la presente memoria está abreviado y es intercambiable con el término "GBD".

Grado de identidad

El nexo entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

En una realización, el grado de identidad de secuencia entre una secuencia de consulta y una secuencia de referencia se determina: 1) alineando las dos secuencias mediante cualquier programa de alineación adecuado utilizando la matriz de puntuación por defecto y la penalización de discontinuidad predeterminada, 2) identificando el número de coincidencias exactas, donde una coincidencia exacta es donde el programa de alineación ha identificado un aminoácido o nucleótido idéntico en las dos secuencias alineadas en una posición dada en la alineación y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la secuencia de referencia.

En una realización, el grado de identidad de secuencia entre una secuencia de consulta y una secuencia de referencia se determina: 1) alineando las dos secuencias mediante cualquier programa de alineación adecuado utilizando la matriz de puntuación por defecto y la penalización de discontinuidad predeterminada, 2) identificando el número de coincidencias exactas, donde una coincidencia exacta es donde el programa de alineación ha identificado un aminoácido o nucleótido idéntico en las dos secuencias alineadas en una posición dada en la alineación y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la más larga de las dos secuencias.

En otra realización, el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de consulta y la secuencia de referencia se determina 1) alineando las dos secuencias mediante cualquier programa de alineación adecuado utilizando la matriz de puntuación por defecto y la penalización de discontinuidad predeterminada, 2) identificando el número de coincidencias exactas, donde una coincidencia exacta es donde el programa de alineación ha identificado un aminoácido o nucleótido idéntico en las dos secuencias alineadas en una posición dada en la alineación y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas por la "longitud de alineación", donde la longitud de alineación es la longitud de toda la alineación incluyendo discontinuidades y partes sobresalientes de las secuencias.

Las comparaciones de identidad de secuencia pueden realizarse a simple vista, o más habitualmente, con ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado utilizan complejos algoritmos de comparación para alinear dos o más secuencias que reflejan mejor los casos evolutivos que podrían haber conducido a la(s) diferencia(s) entre las dos o más secuencias. Por lo tanto, estos algoritmos operan con un sistema de puntuación que recompensa la alineación de aminoácidos idénticos o similares y penalizan la inserción de espacios, ampliaciones de espacios y alineación de aminoácidos no similares. El sistema de puntuación de los algoritmos de comparación incluye:

i) asignación de puntuación de penalización cada vez que se inserta un espacio (puntuación de penalización de la ampliación),

ii) asignación de puntuación de penalización cada vez que se extiende un espacio existente con una posición adicional (puntuación de penalización de la ampliación),

iii) asignación de puntuaciones altas al alinear aminoácidos idénticos, y

iv) asignación de puntuaciones variables al alinear aminoácidos diferentes.

La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por espacio. Sin embargo, es preferible utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho programa informático para comparaciones de secuencias.

Las puntuaciones dadas para la alineación de aminoácidos no idénticos se asignan según una matriz de puntuación también denominada matriz de sustitución. Las puntuaciones proporcionadas en dichas matrices de sustitución están reflejando el hecho de que la probabilidad de que un aminoácido que es sustituido por otro durante la evolución varía y depende de la naturaleza física/química del aminoácido que va a ser sustituido. Por ejemplo, la probabilidad de que un aminoácido polar sea sustituido por otro aminoácido polar es mayor en comparación con que sea sustituido por un aminoácido hidrófobo. Por lo tanto, la matriz de puntuación asignará la puntuación más alta para aminoácidos idénticos, una puntuación menor para aminoácidos no idénticos pero similares e incluso una puntuación más baja para aminoácidos diferentes no similares. Las matrices de puntuación más frecuentemente utilizadas son las matrices PAM (Dayhoff *et al.* (1978), Jones *et al.* (1992)), las matrices BLOSUM (Henikoff y Henikoff (1992) y la matriz Gonnet (Gonnet *et al.* (1992)).

Los programas informáticos adecuados para llevar a cabo tal alineación incluyen, pero no se limitan a, Vector NTI (Invitrogen Corp.) y los programas ClustalV, ClustalW y ClustalW2 (Higgins DG y Sharp PM (1988), Higgins *et al.* (1992) Thompson *et al.* (1994), Larkin *et al.* (2007). Una selección de diferentes herramientas de alineación está disponible en el servidor ExPASy Proteomics en www.expasy.org. Otro ejemplo de programa informático que puede realizar la alineación de secuencias es BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que está disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information, que actualmente se puede encontrar en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y que se describió en primer lugar en Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215; 403-410.

En una realización preferida de la presente invención, el programa de alineación está realizando un programa de alineación global, que optimiza la alineación sobre toda la longitud de las secuencias. En una realización preferida adicional, el programa de alineación global se basa en el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman, Saul B. y Wunsch, Christian D. (1970), "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins", *Journal of Molecular Biology* 48 (3):443-53). Ejemplos de programas actuales que realizan alineaciones globales utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch son los programas EMBOSS Needle y EMBOSS Stretcher, que están disponibles en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>.

EMBOSS Needle realiza una alineación óptima de secuencia global utilizando el algoritmo de alineación Needleman-Wunsch para encontrar la alineación óptima (incluyendo los espacios) de dos secuencias a lo largo de toda su longitud.

EMBOSS Stretcher utiliza una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch que permite que las secuencias más grandes estén alineadas globalmente.

En una realización, las secuencias están alineadas mediante un programa de alineación global y la identidad de secuencia se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la "longitud de alineación", donde la longitud de alineación es la longitud de toda la alineación incluyendo espacios y partes sobresalientes de las secuencias.

En una realización adicional, el programa de alineación global utiliza el algoritmo Needleman-Wunsch y la identidad de secuencias se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la "longitud de alineación", donde la longitud de alineación es la longitud de toda la alineación incluidos espacios y partes sobresalientes de las secuencias.

En otra realización más, el programa de alineación global se selecciona del grupo que consiste en EMBOSS Needle y EMBOSS Stretcher y la identidad de secuencia se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la "longitud de alineación", donde la longitud de alineación es la longitud de toda la alineación incluidos los espacios y partes sobresalientes de las secuencias.

Una vez que el programa informático ha producido una alineación, es posible calcular el % de similitud y el % de identidad de secuencia. El programa informático normalmente lo hace como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En una realización, es preferible usar el programa informático ClustalW para realizar alineaciones de secuencias. Preferiblemente, la alineación con ClustalW se lleva a cabo con los siguientes parámetros para la alineación por pares:

Matriz de sustitución:	Gonnet 250
Penalización abierta por espacio:	20
Penalización por ampliación con espacio:	0,2
Penalización por espacio final:	Ninguna

ClustalW2 se ha puesto a disposición, por ejemplo, en Internet por el Instituto Europeo de Bioinformática en la página web del EMBL-EBI www.ebi.ac.uk con herramientas - análisis de secuencias - ClustalW2. Actualmente, la dirección exacta de la herramienta ClustalW2 es www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2.

- 5 En otra realización, se prefiere usar el programa Align X en el Vector NTI (Invitrogen) para realizar alineaciones de secuencias. En una realización, Exp10 se ha podido utilizar con los ajustes predeterminados:

Penalización por apertura de espacio: 10

Penalización por ampliación de espacio: 0,05

Intervalo de penalización por separación de espacio: 8

- 10 En otra realización, la alineación de una secuencia de aminoácidos con, o a, otra secuencia de aminoácidos se determina mediante el uso de la matriz de puntuación: blosum62mt2 y las configuraciones de alineación por pares VectorNTI Pair

Configuraciones	K-tuple	1
	Número de mejores diagonales	5
	Tamaño de ventana	5
	Penalización por espacio	3
	Penalización de abertura de espacio	10
	Penalización por ampliación de espacio	0,1

En una realización, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos con, o a, otra secuencia de aminoácidos se determina mediante el uso de Blast con un tamaño de palabra de 3 y con BLOSUM 62 como matriz de sustitución.

- 15 Polipéptidos

En la presente invención se describe un polipéptido que tiene una relación de actividad transgalactosilante:actividad de β -galactosidasa de al menos 0,5, al menos 1, al menos 2, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12 a una concentración de 3% p/p de concentración inicial de lactosa.

- 20 En la presente memoria se describe un polipéptido, en donde el núcleo catalítico de la glucósido hidrolasa tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 7.

En la presente memoria se describe un polipéptido que contiene dominios Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703) y/o Glyco_hydro 2C (PF02836).

En la presente memoria se describe un polipéptido que contiene el dominio Ig-oide bacteriano (grupo 4) (PF07532).

- 25 En un aspecto, en la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionada del grupo que consiste en:

a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, en donde dicho polipéptido consiste en un máximo de 980 restos de aminoácidos y

- 30 b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2, en el que dicho polipéptido consta como máximo de 975 restos de aminoácidos.

En la presente memoria se da a conocer:

c. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 1.300 restos de aminoácidos,

- 35 d. un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos en condiciones de baja restricción con i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifica el polipéptido de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5; o ii) la cadena complementaria de i),

e. un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de la SEQ ID nº: 1, 2, 3, 4 o 5 o la secuencia de nucleótidos comprendida en las SEQ ID nº: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifican un polipéptido maduro, y

5 f. un polipéptido que comprende una supresión, inserción y/o sustitución conservativa de uno o más restos de aminoácidos de las SEQ ID nº: 1, 2, 3, 4 o 5.

En la presente memoria se da a conocer un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionado del grupo que consiste en:

a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID nº: 3, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 1.300 restos de aminoácidos,

10 b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID nº: 1, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácidos,

c. un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos en condiciones de baja restricción con i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en las SEQ ID nº: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifica el polipéptido de las SEQ ID nº: 1, 2, 3, 4, o 5; o ii) la cadena complementaria de i),

15 d. un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de las SEQ ID nº: 1, 2, 3, 4 o 5 o la secuencia de nucleótidos comprendida en la SEQ ID nº: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifican un polipéptido maduro, y

e. un polipéptido que comprende una supresión, inserción y/o sustitución conservativa de uno o más restos de aminoácidos de la SEQ ID nº: 1, 2, 3, 4 o 5.

20 En un aspecto, en la presente memoria se describe un polipéptido, en donde la secuencia de aminoácidos tiene al menos 98%, o 99%, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID nº: 1 o 2.

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 90% con la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID nº: 1.

25 En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 90% con la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID nº: 2.

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene un 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID nº: 3.

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 96,5% con la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID nº: 4.

30 En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene un 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID nº: 5.

En la presente memoria se describe un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº: 1, 2, 3, 4 o 5.

En una realización, se describe en la presente memoria un polipéptido, que procede de *Bifidobacterium bifidum*.

35 En una realización, se describe en la presente memoria un polipéptido que tiene un pH óptimo de 6,5-7,5.

En una realización, se describe en la presente invención un polipéptido que tiene un óptimo de temperatura de 30-60 tal como 42-60 grados Celcius.

40 Los polipéptidos que tienen actividad sobre los hidratos de carbono se pueden clasificar usando el sistema de clasificación IUBMB basado en su especificidad de sustrato o en la asignación de CaZy en una de las 125 familias de glucósido hidrolasa actuales. En la base de datos CaZy la asignación se basa tanto en información secuencial como estructural combinada con el conocimiento de la estereoquímica de los sustratos y productos.

45 En la presente memoria se describen polipéptidos que cuando se trata de un producto de expresión en un *Bacillus subtilis* cepa BG3594 de una secuencia de ácido nucleico, que codifica dicho polipéptido, es el único producto de expresión de polipéptido de dicha secuencia de ácido nucleico que presenta actividad transgalactosilante. Esto puede evaluarse utilizando las siguientes técnicas conocidas por un experto en la técnica. Las muestras a evaluar se someten a SDS-PAGE y se visualizan usando un colorante apropiado para la cuantificación de proteínas, tal como por ejemplo el sistema Criterion de Bio-Rad. El gel se escanea a continuación utilizando un escáner densitométrico apropiado tal como por ejemplo el sistema Criterion de Bio-Rad y se asegura que la imagen resultante esté en el intervalo dinámico. Las bandas correspondientes a cualquier variante/fragmento procedente de la SEQ ID nº: 8 se

cuantifican y el porcentaje de los polipéptidos se calcula como: Porcentaje de polipéptido en cuestión/(suma de todos los polipéptidos que presentan actividad transgalactosilante)*100.

El número total de variantes/fragmentos de polipéptidos procedentes de la SEQ ID n°: 8 en la composición puede determinarse detectando el fragmento procedente de la SEQ ID n°: 8 por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal por métodos conocidos por un experto en la técnica.

El polipéptido descrito en la presente invención comprende al menos dos dominios funcionales separados contenidos dentro de la enzima. En primer lugar, el polipéptido debe contener un núcleo catalítico de glucósido hidrolasa como se describe a continuación. El núcleo catalítico debe pertenecer al clan GH-A de familias de glucósido hidrolasa relacionadas. El clan GH-A se caracteriza por la escisión de enlaces glucosídicos mediante un mecanismo de retención y posee un dominio catalítico que se basa en un pliegue de barril TIM (Wierenga, 2001, *FEBS Letters*, 492 (3), págs. 193-8). El dominio catalítico contiene dos restos de ácido glutámico que actúan como donante de protones y nucleófilo, que eliminan de las cadenas 4 y 7 del dominio de barril (Jenkins, 1995, *FEBS Letters*, 362 (3), págs. 281-5). La estructura general del barril TIM es un (β/α) 8 veces que consta de 8 cadenas beta y 8 cadenas alfa. En un aspecto, el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa descrito en la presente memoria pertenece a cualquiera de las familias GH-2 y -35 de glucósido hidrolasa que son todas las enzimas TIM-barril pertenecientes al clan GH-A. En otro aspecto, el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa pertenece a la familia GH-2 o GH-35. En otro aspecto, el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa pertenece a la familia GH-2. Un denominador común es que estas enzimas se denominan enzimas de retención, de modo que la estereoquímica del sustrato se conserva en el producto (Henrissat, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(5), 637-44).

Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden tener actividad sobre enlaces de hidratos de carbono que tienen la configuración $\beta(1\rightarrow4)$. Esto efectivamente colocó las enzimas en la clase EC 3.2.1.23 de la IUBMB de β -galactosidasas. Esta actividad puede ser, pero no se limita a, determinada utilizando sustratos sintéticos tales como para-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (PNPG), orto-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG) o β -D-galactopiranosido con agluconas cromógenas (XGal). Como una forma alternativa de determinar si una enzima pertenece a la clase EC 3.2.1.23 de β -galactosidasas es incubar con un sustrato tal como la lactosa y medir la liberación de glucosa por un método tal como determinación enzimática, HPLC, TLC u otros métodos conocido por los expertos en la técnica.

Con objeto de predecir entidades funcionales de polipéptidos se pueden aplicar varios fondos públicos disponibles tales como, por ejemplo, Pfam (*Nucl. Acids Res.* (2010) 38 (supl. 1): D211-D222, doi: 10.1093/nar/gkp985) e Interpro (*Nucl. Acids Res.* (2009) 37 (supl. 1): D211-D215, doi: 10.1093/nar/gkn785). Debe especificarse que al realizar dicho análisis, el análisis debería realizarse en la toda la secuencia del polipéptido disponible a partir de las bases de datos del fondo público.

Se proporciona un polipéptido que contiene uno o más dominios Pfam seleccionados de: Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532). Se proporciona además un polipéptido que contiene los dominios Pfam Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig Bacteriano (grupo 4) (PF07532).

También se proporciona un polipéptido que contiene los dominios Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703) y Glyco_hydro 2C (PF02836) que constituye el dominio catalítico del polipéptido.

- Se proporciona un polipéptido como el descrito en la presente memoria y que tiene una relación de actividad transgalactosilante:actividad de β -galactosidasa de al menos 1, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12 medida a una concentración de 100 ppm en un ensayo basado en leche a 37°C y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180, tal como 180 minutos de reacción. En una realización adicional, el polipéptido procede de *Bifidobacterium bifidum*.

En una realización, el polipéptido o los polipéptidos descritos en la presente memoria tienen una actividad transgalactosilante tal que más del 20%, más del 30%, más del 40%, hasta el 50% de la lactosa inicial está transgalactosilada, medida a una concentración de 100 ppm en un ensayo basado en leche a 37°C y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180, tal como 180 minutos de reacción.

En una realización adicional, el o los polipéptidos descritos en la presente memoria tienen una actividad β -galactosidasa tal que menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30% menos de 20% de la lactosa se ha hidrolizado medida a una concentración de 100 ppm en un ensayo basado en leche a 37°C y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180°C, tal como 180 minutos de reacción.

En una realización, la actividad β -galactosidasa y/o la actividad transgalactosilante se miden a una concentración de 100 ppm correspondiente a 2.13 LAU como se especifica en el método 4.

En una realización adicional, el o los polipéptidos descritos en la presente memoria tienen una o más de las siguientes características:

a) una relación de actividad transgalactosilante:actividad β -galactosidasa de al menos 1, al menos 2,5, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, o al menos 12, medida a una concentración de 100 ppm en un ensayo basado en leche a 37°C y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180°C, tal como 180 minutos de reacción, y/o

- 5 b) tiene una actividad transgalactosilante tal que más del 20%, más del 30%, más del 40% y hasta el 50% de la lactosa inicial se ha transgalactosilado, medida a una concentración de 100 ppm en un ensayo basado en leche a 37°C y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180°C, tal como 180 minutos de reacción.

Se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3, en el que dicho polipéptido consiste en un máximo de 1.300 restos de aminoácidos. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, tal como en donde dicha identidad de secuencia es al menos 99% o al menos 100% de identidad de secuencia, y en donde dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácidos. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácidos. En otro aspecto aún, se proporciona un polipéptido en el que dicho polipéptido tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, tal como en el que dicho polipéptido tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1. En otro aspecto, un polipéptido que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2, tal como en donde dicho polipéptido tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2. En un aspecto, se proporcionan los polipéptidos descritos en el presente memoria que constan como máximo de 975 restos de aminoácidos, tales como, p. ej., como máximo 970 restos de aminoácidos, tales como 950 restos de aminoácidos como máximo, tales como 940 restos de aminoácidos como máximo, 930 restos de aminoácidos como máximo, 920 restos de aminoácidos como máximo, 910 restos de aminoácidos como máximo, 900 restos de aminoácidos como máximo, 895 restos de aminoácidos como máximo o 890 restos de aminoácidos como máximo. En un aspecto, se proporciona un polipéptido concreto constituido por 887 o 965 restos de aminoácidos. En un aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ. ID. n°: 2 tal como en donde dicha identidad de secuencia es al menos 99% o al menos 100% de identidad de secuencia, en donde dicho polipéptido consta de 975 restos de aminoácidos como máximo, tal como, p. ej., como máximo 970 o al menos 965 restos de aminoácidos. En un aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2, en donde dicho polipéptido consta en un máximo de 975 restos de aminoácido.

En otro aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que comprende la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. Todavía en un aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, especialmente un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 1 o 2.

- 35 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3, tal como en donde dicha identidad de secuencia es al menos 97%, tal como, p. ej., al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% de identidad de secuencia, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 1300 restos de aminoácidos.

40 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido en donde dicho polipéptido tiene al menos un 98,5%, tal como al menos 99% o al menos 99,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 5. En un aspecto, dicho polipéptido consiste en como máximo 1.290 restos de aminoácidos, tales como, p. ej., como máximo 1.280, como máximo 1.270, como máximo 1.260, como máximo 1.250, como máximo 1.240, como máximo 1.230, como máximo 1.220 o como máximo 1.215 restos de aminoácidos. En un aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que consiste en 1.211 restos de aminoácidos.

- 45 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido en el que dicho polipéptido tiene al menos un 96%, tal como al menos 97%, tal como, p. ej., al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 4. En un aspecto, se proporciona un polipéptido que consiste en un máximo de 1.210 restos de aminoácidos, tal como, p. ej., como máximo 1.200, como máximo 1.190, como máximo 1.180, como máximo 1.170, como máximo 1.160, como máximo 1.150 o como máximo 1.145 restos de aminoácidos, tal como 1.142 restos de aminoácidos.

50 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido en donde dicho polipéptido tiene al menos un 96,5%, tal como al menos 97%, tal como, p. ej., al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3. En un aspecto, un polipéptido que consta como máximo 1.130 restos de aminoácidos, tales como, por ejemplo, como máximo 1.120, como máximo 1.110, como máximo 1.100, como máximo 1.090, como máximo 1.080, como máximo 1.070, como máximo 1.060, como máximo 1.050, como máximo 1.055 o como máximo 1.040 restos de aminoácidos.

55 En un aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que consiste en 1.038 restos de aminoácidos.

En otro aspecto, los polipéptidos descritos en la presente memoria tienen una relación de actividad de transgalactosilación superior al 100%, tal como superior al 150%, 175% o 200%.

Las proteínas generalmente están compuestas de una o más regiones funcionales, comúnmente denominadas dominios. La presencia de diferentes dominios en diversas combinaciones en diferentes proteínas da lugar al diverso repertorio de proteínas encontradas en la naturaleza. Una forma de describir los dominios es mediante la ayuda de la base de datos Pfam que es una gran colección de familias de dominio de proteínas como se describe en "The Pfam protein families database": R.D. Finn, J. Mistry, J. Tate, P. Coghill, A. Heger, J.E. Pollington, O.L. Gavin, P. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman *Nucleic Acids Research* (2010) Database número 38: D211-222. Cada familia está representada por múltiples alineaciones de secuencia y modelos de Markov ocultos (HMM). En otro aspecto, los presentes inventores han descubierto que el/los polipéptido(s) proporcionado(s) contiene uno o más de los dominios Pfam Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836)) y (PF07532). En un aspecto, el polipéptido o polipéptidos proporcionados en la presente invención contienen Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio Ig-oide bacteriano (grupo 4) (PF07532).

En un aspecto, los polipéptidos tienen actividad transgalactosilante útil en un intervalo de pH de 4-9, tal como 5-8, tal como 5,5-7,5, tal como 6,5-7,5.

La presente invención abarca polipéptidos que tienen un cierto grado de identidad de secuencia o homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en la presente memoria o con un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria. La presente invención abarca, en particular, péptidos que tienen un grado de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, que se definen a continuación, o uno de sus homólogos.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos homóloga y/o la secuencia de nucleótidos debe proporcionar y/o codificar un polipéptido que conserva la actividad transgalactosilante funcional y/o potencia la actividad de transgalactosilación en comparación con un polipéptido de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5.

En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 66%, 70%, 75%, 78%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, idéntica a la secuencia en cuestión. Generalmente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque la homología también se puede considerar desde el punto de vista de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología desde el punto de vista de identidad de secuencias.

Por lo tanto, la presente invención también abarca variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido definidos en la presente memoria, en particular los de las SEC ID n° 1, 2, 3, 4 o 5 definidas a continuación.

Las secuencias, particularmente las de variantes, homólogos y derivados de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 que se definen a continuación, también pueden tener supresiones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio imperceptible y producen una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas pueden hacerse basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, naturaleza hidrófoba, hidrófila y/o anfipática de los restos, siempre que se mantenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

La presente invención también abarca una sustitución conservadora (sustitución y reemplazo se emplean en la presente memoria en el sentido de intercambio de un resto de aminoácido existente, por un resto alternativo) que puede ocurrir es decir sustitución de similar por similar como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede ocurrir sustitución no conservadora, es decir, de una clase de resto por otro o, alternativamente, que implica la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (denominada en adelante Z), ácido diaminobutírico ornitina (denominada en adelante B), norleucina ornitina (denominada en adelante O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Las sustituciones conservadoras que pueden realizarse son, por ejemplo, dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos alifáticos (alanina, valina, leucina, isoleucina), aminoácidos polares (glutamina, asparagina, serina, treonina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), hidroxilaminoácidos (serina, treonina), aminoácidos grandes (fenilalanina y triptófano) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina).

En un aspecto, la secuencia polipeptídica utilizada en la presente invención está en forma purificada. En un aspecto, el polipéptido o proteína para uso en la presente invención está en forma aislada.

En un aspecto, el polipéptido de la presente invención se produce de forma biotecnológica.

Los polipéptidos variantes incluyen un polipéptido que tiene un determinado porcentaje, p. ej., al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1 o 2.

Los polipéptidos variantes incluyen un polipéptido que tiene un determinado porcentaje, p. ej., al menos 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 3, 4 o 5.

- 5 En un aspecto, los polipéptidos descritos en la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro codificado por la secuencia de nucleótidos que codifica la transgalactosilasa contenida en *Bifidobacterium bifidum* DSM20215 mostrada en la presente memoria como SEQ ID n°: 22. Todas las consideraciones y limitaciones relativas a las identidades de secuencia y funcionalidad expuestas desde el punto de vista de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 se aplican haciendo los cambios necesarios a las identidades de secuencia y funcionalidad de estos polipéptidos y nucleótidos.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos en cuestión es la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, y la secuencia de nucleótidos en cuestión preferiblemente es la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13.

- 15 En un aspecto, el polipéptido es un fragmento que tiene uno o más (varios) aminoácidos suprimidos del extremo amino y/o carboxilo del polipéptido de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5; en donde el fragmento tiene actividad transgalactosilante.

En un aspecto, un fragmento contiene al menos 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1.000 restos de aminoácidos.

- 20 En otro aspecto, la longitud de la variante de polipéptido es de 500 a 1.300 restos de aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante de polipéptido es de 600 a 1.300 aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante de polipéptido es de 700 a 1.300 aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante de polipéptido es de 800 a 1.300 aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante de polipéptido es de 800 a 1.300 aminoácidos.

Variantes de polipéptidos de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5

- 25 En un aspecto, se proporciona una variante de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 que tiene una sustitución en una o más posiciones que efectúa una propiedad alterada tal como transgalactosilación mejorada, con respecto a la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. Dichas variantes de polipéptidos se denominan también en este documento por conveniencia "polipéptido variante", "variante de polipéptido" o "variante". En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente memoria tienen una actividad transgalactosilante mejorada en comparación con el polipéptido de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. En otro aspecto, los polipéptidos definidos en la presente memoria tienen una velocidad de reacción mejorada en comparación con el polipéptido de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, los polipéptidos y variantes definidos en la presente memoria presentan actividad enzimática. En un aspecto, los polipéptidos y los polipéptidos variantes descritos en la presente memoria comprenden actividad de transgalactosilación.

- 35 En un aspecto, la proporción de actividad transgalactosilante:actividad β -galactosidasa es al menos 0,5, tal como al menos 1, tal como al menos 1,5, o tal como al menos 2 después de 30 minutos de reacción tal como superior a una concentración inicial de lactosa del 3% p/p.

- 40 En un aspecto, la relación actividad transgalactosilante:actividad β -galactosidasa es al menos 2,5, tal como al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7, tal como al menos 8, tal como al menos 9, tal como al menos 10, tal como al menos 11 o tal como al menos 12 después de 30 min. de reacción tal como superior a una concentración inicial de lactosa del 3% p/p.

- En un aspecto, los polipéptidos y las variantes como se definen en la presente memoria pueden proceder de fuentes microbianas, en particular de un hongo filamentoso o levadura, o de una bacteria. La enzima puede proceder, p. ej., de una cepa de *Agaricus*, p. ej. *A. bisporus*; *Ascovaginospora*; *Aspergillus*, p. ej. *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*; *Candida*; *Chaetomium*; *Chaetotomastia*; *Dictyostelium*, p. ej. *D. discoideum*; *Kluveromyces*, p. ej. *K. fragilis*, *K. lactis*; *Mucor*, p. ej. *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, p. ej. *N. crassa*; *Rhizomucor*, p. ej. *R. pusillus*; *Rhizopus*, p. ej. *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, p. ej. *S. libertiana*; *Torula*; *Torulopsis*; *Trichophyton*, p. ej. *T. rubrum*; *Whetzelinia*, p. ej. *W. sclerotiorum*; *Bacillus* p. ej. *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. novalis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Bifidobacterium*, p. ej. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*, p. ej. *C. freundii*; *Clostridium*, p. ej. *C. perfringens*; *Diplodia*, p. ej. *D. gossypina*; *Enterobacter*, p. ej. *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, p. ej. *E. herbicola*; *Escherichia*, p. ej. *E. coli*; *Klebsiella*, p. ej. *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothesium*; *Mucor*; *Neurospora*, p. ej. *N. crassa*; *Proteus*, p. ej. *P. vulgaris*; *Providencia*, p. ej. *P. stuartii*; *Pycnoporus*, p. ej. *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*; *Ruminococcus*, p. ej. *R. torques*; *Salmonella*, p. ej. *S. typhimurium*; *Serratia*, p. ej. *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, p. ej. *S. flexneri*; *Streptomyces*, p. ej. *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. violeceoruber*; *Trametes*; *Trichoderma*, p. ej. *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, p. ej. *Y. Enterocolitica*.

Se proporciona un polipéptido aislado y/o purificado que comprende un polipéptido o un polipéptido variante como se define en la presente memoria. En una realización, el polipéptido variante es una forma madura del polipéptido (SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5). En un aspecto, las variantes incluyen un dominio en el terminal C.

5 En un aspecto, un polipéptido variante como se define en la presente memoria incluye variantes en las que se han añadido o eliminado entre uno y aproximadamente 25 restos de aminoácidos con respecto a la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, un polipéptido variante definido en la presente memoria incluye variantes en las que entre uno y 25 restos de aminoácidos se han sustituido, añadido o eliminado con respecto a la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, la variante tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se ha sustituido cualquier número entre uno y aproximadamente 25 aminoácidos. En otro aspecto, la variante tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se ha sustituido cualquier número entre tres y doce aminoácidos. En otro aspecto, la variante tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se ha sustituido cualquier número entre cinco y nueve aminoácidos.

En un aspecto, se han sustituido al menos dos, en otro aspecto, al menos tres, y aún en otro aspecto, al menos cinco aminoácidos de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5.

15 En un aspecto, el o los polipéptido(s) descrito(s) tiene(n) la secuencia 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, el o los polipéptido(s) descrito(s) en la presente invención tiene la secuencia SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se sustituyen y/o se suprimen el aminoácido 10, tal como el 9, tal como el 8, tal como el 7, tal como el 6, tal el 5, tal como el 4, tal el 3, tal como el 2, tal como el 1 en el extremo terminal N.

20 Las enzimas y sus variantes enzimáticas pueden caracterizarse por sus secuencias de ácido nucleico y polipéptido primario, por modelado estructural tridimensional, y/o por su actividad específica. Las características adicionales de las variantes de polipéptido o polipéptido definidas en la presente memoria incluyen, por ejemplo, estabilidad, intervalo de pH, estabilidad a la oxidación y estabilidad térmica. Los niveles de expresión y la actividad enzimática se pueden evaluar empleando ensayos normalizados conocidos por el especialista en este campo. En otro aspecto, las variantes demuestran características de comportamiento mejoradas con respecto al polipéptido con la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5, tal como una mejor estabilidad a altas temperaturas, p. ej., 65-85°C.

Se proporciona una variante de polipéptido como se define en la presente memoria con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% de identidad con el polipéptido de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5.

Nucleótidos

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad transgalactosilante como se ha indicado anteriormente que están codificados por polinucleótidos que se hibridan en condiciones de muy baja severidad, preferiblemente condiciones de baja severidad, más preferiblemente condiciones de media severidad, más preferiblemente condiciones de media-alta severidad incluso más preferiblemente condiciones de alta severidad y aún más preferiblemente condiciones de muy alta severidad con i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en las SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifican el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5; ii) la secuencia de cDNA de i) o iii) la cadena complementaria de i) o ii), (J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). Una subsecuencia de la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento polipeptídico que tiene actividad de lactasa.

40 La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 o una subsecuencia de la misma, así como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 o un fragmento de la misma, pueden utilizarse para diseñar una sonda de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad transgalactosilasa a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, dichas sondas pueden utilizarse para la hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos normalizados de transferencia Southern, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben ser al menos de 14, preferiblemente al menos de 25, más preferiblemente al menos de 35 y lo más preferiblemente al menos de 70 nucleótidos de longitud. Es, sin embargo, se prefiere que la sonda de ácido nucleico tenga una longitud de al menos 100 nucleótidos. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede ser al menos de 200 nucleótidos, preferiblemente al menos de 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos de 400 nucleótidos o aún más preferiblemente al menos de 500 nucleótidos de longitud. Pueden usarse sondas aún más largas, p. ej., sondas de ácido nucleico que son al menos de 600 nucleótidos, al menos preferiblemente al menos de 700 nucleótidos, más preferiblemente al menos de 800 nucleótidos o aún más preferiblemente al menos 900 nucleótidos de longitud. Pueden usarse sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas están generalmente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina, o avidina). Dichas sondas están comprendidas por la presente invención.

Una genoteca de ADN genómico preparada a partir de dichos otros organismos puede rastrearse, por lo tanto, para ADN que se hibrida con las sondas descritas anteriormente y que codifica un polipéptido que tiene actividad de

lactasa. El ADN genómico u otro de dichos otros organismos puede separarse por electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida u otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado puede transferirse e inmovilizarse sobre nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Con objeto de identificar un clon o ADN que es homólogo con la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13 o una de sus subsecuencias, el material portador se usa en una

transferencia Southern.

Para los propósitos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos se hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13, su cadena complementaria o una de sus subsecuencias, en condiciones de muy baja a muy alta severidad. Las moléculas a las que la sonda de ácido nucleico se hibrida en estas condiciones se pueden detectar usando película de rayos X.

En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la región codificante de polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, se definen condiciones de muy baja a muy alta severidad como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3%, 200 g/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 25% de formamida para muy bajas y bajas severidades, 35% de formamida para medias y medias-altas severidades, o formamida al 50% para altas y muy altas severidades, siguiendo procedimientos normalizados de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas de manera óptima.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces cada 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0,2% preferiblemente al menos a 45°C (muy baja severidad), más preferiblemente al menos a 50°C, más preferiblemente al menos a 55°C (severidad media), más preferiblemente al menos a 60°C (severidad medio-alta), aún más preferiblemente al menos a 65°C (alta severidad), y lo más preferible al menos a 70°C (muy alta severidad).

En una realización concreta, el lavado se lleva a cabo usando 0,2X SSC, SDS al 0,2% preferiblemente al menos a 45°C (muy baja severidad), más preferiblemente al menos a 50°C (baja severidad), más preferiblemente al menos a 55°C (severidad media), más preferiblemente al menos a 60°C (media-alta severidad), aún más preferiblemente al menos a 65°C (alta severidad), y lo más preferiblemente al menos a 70°C (muy alta severidad). En otra realización concreta, el lavado se lleva a cabo usando 0,1 X SSC, SDS al 0,2% preferiblemente al menos a 45°C (muy baja severidad), más preferiblemente al menos a 50°C (baja severidad), más preferiblemente al menos a 55°C (media severidad), más preferiblemente al menos a 60°C (media-alta severidad), aún más preferiblemente al menos a 65°C (alta severidad), y lo más preferiblemente al menos a 70°C (muy alta severidad).

Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de severidad se definen como prehibridación, hibridación y lavado después de la hibridación de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculado empleando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en NaCl 0,9 M, Tris-HCl 0,09 M pH 7,6, EDTA 6 mM, NP-40 al 0,5%, 1X solución de Denhardt, pirofosfato sódico 1 mM, fosfato sódico monobásico 1 mM, ATP 0,1 mM y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos normalizados de transferencia Southern.

Para sondas cortas que tienen una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, el material portador se lava una vez en 6X SCC más 0,1% de SDS durante 15 minutos y dos veces cada 15 minutos usando 6X SSC a 5°C a 10°C inferior a la T_m calculada.

En condiciones de hibridación que contienen sal, la T_m eficaz es la que controla el grado de identidad deseado entre la sonda y el ADN unido al filtro para la hibridación con éxito. La T_m eficaz puede determinarse usando la fórmula siguiente para determinar el grado de identidad requerida para que dos ADN se hibriden en diversas condiciones de severidad.

T_m eficaz = $81,5 + 16,6(\log M[Na^+]) + 0,41(\% G + C) - 0,72(\% \text{ de formamida})$ (Véase www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/dna/dna6.htm)

El contenido de G + C de la SEQ ID n°: 10 es del 42% y el contenido de G + C de la SEQ ID n°: 11 es del 44%. Para una severidad media, la formamida es 35% y la concentración de Na^+ para 5X SSPE es 0,75 M.

Otra relación relevante es que un desajuste del 1% de dos ADN disminuye la T_m en 1,4°C. Para determinar el grado de identidad requerido para que dos ADN se hibriden en condiciones de media severidad a 42°C, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Homología} = 100 - [(T_m \text{ eficaz} - \text{Temperatura de hibridación}) / 1,4]$$

(Véase www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/dna/dna6.htm)

Los ácidos nucleicos variantes incluyen un polinucleótido que tiene un determinado porcentaje, p. ej., 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%, de identidad de secuencia con el ácido nucleico que codifica la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido como el descrito en la presente memoria. En otro aspecto, el ácido nucleico descrito en la presente memoria tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 60%, tal como al menos 65%, tal como al menos 70%, tal como al menos 75%, tal como al menos 80% tal como al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 99% de la SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13. En un aspecto, un plásmido que comprende un ácido nucleico tal como se describe en la presente memoria.

En un aspecto, se proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico como se describe en este documento, o capaz de expresar un polipéptido como se describe en la presente memoria.

Se proporciona un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de polipéptidos definidos y expuestos en la presente memoria. Además, se proporciona un ácido nucleico capaz de hibridarse con el complemento. En otra realización, la secuencia para su utilización en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una secuencia sintética. Incluye, pero no se limita a, secuencias hechas con un uso óptimo de codones para expresión en organismos anfitriones, tales como levaduras. Las variantes de polipéptidos proporcionados en la presente invención pueden producirse por síntesis o por expresión recombinada en una célula anfitriona, según procedimientos bien conocidos en la técnica. En un aspecto, el o los polipéptido(s) descrito(s) en la presente memoria es o son el o los polipéptido(s) recombinado(s). La variante de polipéptido expresada como se define en la presente memoria se aísla opcionalmente antes de su uso.

En otra realización, la variante de polipéptido como se define en la presente memoria se purifica después de la expresión. Los métodos de modificación genética y producción biotecnológica de variantes de polipéptidos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 7.371.552, n° 7.166.453; n° 6.890.572; y n° 6.667.065; y solicitudes de patente publicadas de EE.UU. n° 2007/0141693; n° 2007/0072270; n° 2007/0020731; n° 2007/0020727; n° 2006/0073583; n° 2006/0019347; n° 2006/0018997; n° 2006/0008890; n° 2006/0008888 y n° 2005/0137111.

Se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con un ácido nucleico que codifica la proteína de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos aproximadamente 60%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13.

Vectores

En un aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido. En un aspecto, una célula bacteriana comprende el vector. En algunas realizaciones, un montaje de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante se transfiere a una célula anfitriona en un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia codificadora. El vector puede ser cualquier vector que pueda ser integrado en un genoma de célula anfitriona fúngica y replicado cuando se introduce en la célula anfitriona. El Catálogo de Cepas de la FGSC, Universidad de Missouri, da una lista de vectores adecuados. Más ejemplos de vectores de expresión y/o integración adecuados se proporcionan en Sambrook *et al.*, CLONING MOLECULAR: A LABORATORY MANUAL, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001); Bennett *et al.*, MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991), págs. 396-428; y la patente de EE.UU. n° 5.874.276. Los vectores ejemplares incluyen pFB6, pBR322, pUC18, pUC100 y pENTR/D, pDON™201, pDONR™221, pENTR™, pGEM®3Z y pGEM®4Z. Ejemplos de utilización en células bacterianas incluyen pBR322 y pUC19, que permiten la replicación en *E. coli*, y pE194, por ejemplo, que permite la replicación en *Bacillus*.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica una variante está operativamente unido a un activador adecuado, que permite la transcripción en la célula anfitriona. El activador puede proceder de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula anfitriona. Ejemplos no restrictivos adecuados de activadores incluyen activadores *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. En una realización, el activador es el que es innato a la célula anfitriona. Por ejemplo, cuando *P. saccharophila* es el anfitrión, el activador es un activador innato de *P. saccharophila*. Un "activador inducible" es un activador que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. En otra realización, el activador es el que es heterólogo para la célula anfitriona.

En algunas realizaciones, la secuencia codificadora está operativamente unida a una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal. En otro aspecto, un péptido señal representativo es la SEQ ID n°: 27. Un péptido señal representativo es la SEQ ID n°: 9 que es la secuencia señal natural del precursor aprE de *Bacillus subtilis*. En otras realizaciones, el ADN que codifica la secuencia señal se reemplaza por una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de otros precursores extracelulares de *Bacillus subtilis*. En una realización, el polinucleótido que codifica la secuencia señal está inmediatamente aguas arriba y en el marco del polinucleótido que codifica el polipéptido. La secuencia señal puede seleccionarse de la misma especie que la célula anfitriona.

En otras realizaciones, una secuencia señal y una secuencia activadora que comprende un montaje o vector de ADN que ha de introducirse en una célula anfitriona fúngica proceden de la misma fuente. En algunas realizaciones, el vector de expresión también incluye una secuencia de terminación. En una realización, la secuencia de terminación y la secuencia activadora proceden de la misma fuente. En otra realización, la secuencia de terminación es homóloga a la célula anfitriona.

En algunas realizaciones, un vector de expresión incluye un marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen aquellos que confieren resistencia a agentes antimicrobianos, p. ej., higromicina o fleomicina. Los marcadores selectivos para nutrición también son adecuados e incluyen *amdS*, *argB* y *pyr4*. En una realización, el marcador selectivo es el gen *amdS*, que codifica la enzima acetamidasa; permite que las células transformadas crezcan en acetamida como fuente de nitrógeno. El uso de un gen *amdS* de *A. nidulans* como marcador selectivo se describe en Kelley *et al.*, *EMBO J.* 4: 475-479 (1985) y Penttilä *et al.*, *Gene* 61: 155-164 (1987).

Un vector de expresión adecuado que comprende un montaje de ADN con un polinucleótido que codifica una variante puede ser cualquier vector que sea capaz de replicarse de forma autónoma en un organismo anfitrión dado o de integrarse en el ADN del anfitrión. En algunas realizaciones, el vector de expresión es un plásmido. En algunas realizaciones, se contemplan dos tipos de vectores de expresión para obtener la expresión de genes. El primer vector de expresión comprende secuencias de ADN en las que el activador, la región codificadora y el terminador proceden todos del gen a expresar. En algunas realizaciones, el truncamiento del gen se obtiene eliminando secuencias de ADN no deseadas para dejar el dominio a expresar bajo el control de sus propias secuencias reguladoras de transcripción y traducción. El segundo tipo de vector de expresión está preensamblado y contiene las secuencias necesarias para la transcripción de alto nivel y un marcador seleccionable. En algunas realizaciones, la región codificadora para un gen o parte del mismo se inserta en este vector de expresión de uso general, de manera que está bajo el control de la transcripción de las secuencias activadora y terminadora del montaje de expresión. En algunas realizaciones, los genes o parte de los mismos se insertan aguas abajo del fuerte activador *cbh1*.

Anfitriones de expresión/células anfitrionas

En otro aspecto, se proporciona una célula anfitriona que comprende, preferiblemente transformada con, un plásmido como se describe en la presente memoria o un vector de expresión como se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporciona una célula capaz de expresar un polipéptido como se describe en la presente memoria.

En un aspecto, la célula anfitriona como se describe en la presente memoria, o la célula como se describe en la presente memoria es una célula bacteriana, fúngica o de levadura.

En otro aspecto, la célula anfitriona se selecciona del grupo que consiste en *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torula*, *Torulopsis* y *Aspergillus*.

En otro aspecto, la célula anfitriona se selecciona del grupo que consiste en *Ruminococcus hansenii*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Lactococcus lactis*.

En otra realización, las células anfitrionas adecuadas incluyen una bacteria Gram positiva seleccionada del grupo que consiste en *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *S. murinus*; o una bacteria Gram negativa, en la que dicha bacteria Gram negativa es *Escherichia coli* o una especie *Pseudomonas*. En un aspecto, la célula anfitriona es una *B. subtilis* o *B. licheniformis*. En una realización, la célula anfitriona es *B. subtilis*, y la proteína expresada está genéticamente modificada para comprender una secuencia señal de *B. subtilis*, como se expone con más detalle a continuación. En un aspecto, la célula anfitriona expresa el polinucleótido como se expone en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, una célula anfitriona genéticamente modificada para expresar una variante de polipéptido como se define en la presente memoria con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% con el polipéptido de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica una variante de polipéptido como se define en la presente memoria tendrá una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente una identidad de secuencia de 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con un ácido nucleico que codifica la proteína de SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos aproximadamente 60%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de SEQ ID n°: 9, 10, 11, 12 o 13.

Métodos para producir polipéptidos

En otro aspecto, un método para expresar un polipéptido como se describe en la presente memoria comprende obtener una célula anfitriona o una célula tal como se describe en la presente memoria y expresar el polipéptido de la célula o célula anfitriona, y opcionalmente purificar el polipéptido.

Una expresión característica significa un nivel alterado de expresión de la variante, cuando la variante se produce en una célula anfitriona concreta. La expresión se refiere generalmente a la cantidad de variante activa que es recuperable de un caldo de fermentación empleando técnicas normalizadas conocidas en esta técnica durante un tiempo dado. La expresión también puede relacionarse con la cantidad o tasa de variante producida dentro de la célula anfitriona o segregada por la célula anfitriona. La expresión también puede relacionarse con la velocidad de traducción del ARNm que codifica el polipéptido variante.

10 Transformación, expresión y cultivo de las células anfitrionas

La introducción de un montaje o vector de ADN en una célula anfitriona incluye técnicas tales como transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, p. ej., mediada por lipofección y transfección mediada por DEAE-Dextrina; incubación con precipitado de ADN con fosfato de calcio; bombardeo a alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN; y fusión de protoplastos. Las técnicas generales de transformación son conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Ausubel *et al.* (1987), anteriormente, capítulo 9; Sambrook *et al.* (2001), anteriormente; y Campbell *et al.*, *Curr. Genet.* 16: 53-56 (1989). La expresión de la proteína heteróloga en *Trichoderma* se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.022.725 ; patente de EE.UU. nº 6.268.328; Harkki *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* 13: 227-233 (1991); Harkki *et al.*, *BioTechnol.* 7: 596-603 (1989); EP 244.234 ; y EP 215.594 . En una realización, se construyen transformantes genéticamente estables con sistemas vectoriales por lo que el ácido nucleico que codifica una variante se integra de forma estable en un cromosoma de célula anfitriona. Los transformantes se purifican entonces mediante técnicas conocidas.

En un ejemplo no restrictivo, los transformantes estables que incluyen un marcador *amdS* se distinguen de los transformantes inestables por su velocidad de crecimiento más rápida y la formación de colonias circulares con un contorno liso, en vez de irregular en el medio de cultivo sólido que contiene acetamida. Además, en algunos casos se lleva a cabo una prueba adicional de estabilidad cultivando los transformantes en un medio sólido no selectivo, p. ej., un medio que carece de acetamida, recogiendo esporas de este medio de cultivo y determinando el porcentaje de estas esporas que posteriormente germinan y crecen en el medio selectivo que contiene acetamida. Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para seleccionar transformantes.

Identificación de actividad

Para evaluar la expresión de una variante en una célula anfitriona, los ensayos pueden medir la actividad la proteína expresada, del ARNm correspondiente o de la β -galactosidasa. Por ejemplo, los ensayos adecuados incluyen transferencia Northern y Southern, RT-PCR (reacción en cadena de transcriptasa polimerasa inversa), e hibridación *in situ*, utilizando una sonda de hibridación apropiadamente marcada. Los ensayos adecuados también incluyen la medición de la actividad en una muestra. Ensayos adecuados de la actividad de la variante incluyen, pero no se limitan a, ensayos basados en ONPG o la determinación de glucosa en mezclas de reacción tal como se describe por ejemplo en los métodos y ejemplos en la presente memoria.

Métodos para purificar los polipéptidos descritos en la presente memoria

En general, una variante producida en el cultivo celular se segrega en el medio y puede purificarse o aislarse, p. ej., eliminando componentes no deseados del medio de cultivo celular. En algunos casos, una variante puede recuperarse de un lisado celular. En tales casos, la enzima se purifica en las células en las que se produjo usando técnicas habitualmente empleadas por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo cromatografía de afinidad, métodos cromatográficos de intercambio iónico, incluido intercambio iónico de alta resolución, cromatografía de interacción hidrófoba, separación bifásica, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando Sephadex G-75. Dependiendo del uso pretendido, el o los polipéptido(s) descrito(s) puede(n), por ejemplo, ser liofilizado(s) o preparado(s) en una solución. En un aspecto, el o los polipéptido(s) descrito(s) en la presente memoria está(n) en forma liofilizada. En otro aspecto, el o los polipéptido(s) descrito(s) está(n) en solución.

Composiciones, aplicación y uso

50 Métodos de inmovilización y formulación de los polipéptidos descritos en la presente invención

Las composiciones de polipéptidos pueden prepararse según métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de granulado o microgranulado. El polipéptido a incluir en la composición puede estabilizarse según métodos conocidos en la técnica. A continuación se dan ejemplos de usos preferidos de los polipéptidos o composiciones polipeptídicas de la invención.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para producir un producto alimenticio tratando un sustrato que comprende lactosa con un polipéptido como se describe en la presente memoria.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para producir un producto lácteo tratando un sustrato lácteo que comprende lactosa con un polipéptido como se describe en la presente memoria.

- 5 En un aspecto, el sustrato que comprende lactosa se trata además con una beta-galactosidasa hidrolizante.

El preparado enzimático, tal como en forma de ingrediente alimentario preparado según la presente invención, puede estar en forma de solución o en forma sólida - dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. La forma sólida puede ser como polvo enzimático seco o como enzima granulada.

- 10 Entre los ejemplos de formulaciones enzimáticas anhidras se incluyen productos secados por pulverización, productos de granulación de mezcladores, productos en capas tales como gránulos de lecho fluido, productos comprimidos en gránulos extruidos o granulados, productos liofilizados.

El preparado enzimático, tal como en forma de un ingrediente alimentario preparado según la presente invención, puede estar en forma de solución o en forma sólida - dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. La forma sólida puede ser como polvo enzimático seco o como enzima granulada.

- 15 En un aspecto, se proporciona una composición preferiblemente una composición alimenticia, más preferiblemente un producto lácteo que comprende una célula o un polipéptido como se describe en la presente memoria.

- Además, en la presente memoria se describe una composición que comprende al menos 5%, tal como, p. ej., 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% p/p de uno o más polipéptido(s) como se describe en la presente memoria en base a la cantidad total de polipéptidos en la composición que tiene al menos 70%, p. ej., 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 22. Esto se puede evaluar usando las siguientes técnicas conocidas por un experto en la técnica. Las muestras a evaluar se someten a SDS-PAGE y se visualizan usando un colorante apropiado para la cuantificación de proteínas, tal como por ejemplo el sistema Criterion de Bio-Rad. El gel se escanea a continuación utilizando un escáner densiométrico apropiado tal como por ejemplo el sistema Criterion de Bio-Rad y se asegura que la imagen resultante esté en el intervalo dinámico. Las bandas correspondientes a cualquier variante/fragmento procedente de la SEQ ID n°: 8 se cuantifican y el porcentaje de los polipéptidos se calcula como: Porcentaje de polipéptido en cuestión = polipéptido en cuestión/(suma de todos los polipéptidos que presentan actividad transgalactosilante) * 100. El número total de variantes/fragmentos de polipéptidos procedente de la SEQ ID n°: 8 en la composición puede determinarse detectando el fragmento procedente de la SEQ ID n°: 8 por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal por métodos conocidos por un experto en la técnica.

- En un aspecto, la composición según la presente invención comprende uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consta de un polipéptido que consiste en la SEQ ID n°: 1, 2, 3, 4 y 5. En otro aspecto, la composición comprende uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consta de un polipéptido que consiste en SEQ ID n°: 1, 2 y 3. En aún otro aspecto, la composición comprende uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consta de un polipéptido que consiste en las SEQ ID n°: 1 y 2.

En un aspecto, la invención proporciona un preparado complejo enzimático que comprende el complejo enzimático según la invención, un vehículo enzimático y opcionalmente un estabilizante y/o un conservante.

En aún otro aspecto de la invención, el portador enzimático se selecciona del grupo que consiste en glicerol o agua.

- 40 En otro aspecto, el preparado/composición comprende un estabilizante. En un aspecto, el estabilizante se selecciona del grupo que consiste en sales inorgánicas, polioles, azúcares y una de sus combinaciones. En un aspecto, el estabilizante es una sal inorgánica tal como cloruro de potasio. En otro aspecto, el poliol es glicerol, propilenglicol o sorbitol. En otro aspecto todavía, el azúcar es un hidrato de carbono de molécula pequeña, en concreto cualquiera de varios de sabor dulce tales como glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa.

- 45 Todavía en otro aspecto, el preparado comprende un conservante. En un aspecto, el conservante es metil-parabeno, propil-parabeno, benzoato, sorbato u otros conservantes aprobados para alimentos o una de sus mezclas.

- El método de la invención puede practicarse con enzimas inmovilizadas, p. ej., una lactasa inmovilizada u otras enzimas productoras de galactooligosacáridos. La enzima puede inmovilizarse sobre cualquier soporte orgánico o inorgánico. Ejemplos de soportes inorgánicos incluyen alúmina, Celite, cloruro-Dowex-1, perlas de vidrio y gel de sílice. Ejemplos de soportes orgánicos incluyen DEAE-celulosa, hidrogeles de alginato o perlas de alginato o equivalentes. En diversos aspectos de la invención, la inmovilización de la lactasa puede optimizarse por adsorción física sobre el soporte inorgánico. Las enzimas utilizadas para poner en práctica la invención pueden inmovilizarse en diferentes medios, incluidos agua, tampón Tris-HCl y solución tamponada con fosfato. La enzima puede inmovilizarse en cualquier tipo de sustrato, p. ej., filtros, fibras, columnas, perlas, coloides, geles, hidrogeles, mallas y similares.

- En un aspecto, se proporciona un método para producir un producto lácteo tratando un sustrato lácteo que comprende lactosa con un polipéptido como se describe en la presente memoria. En otro aspecto, se proporciona un método para producir un producto lácteo tratando un sustrato lácteo que comprende lactosa con un polipéptido que tiene una actividad de transgalactosilación relativa superior al 60%, tal como superior al 70%, tal como superior al 75% después de 15 min. de reacción. En un aspecto, la actividad de transgalactosilación relativa es superior a 3 después de 30 min. de reacción. En otro aspecto, la actividad de transgalactosilación relativa es superior a 6 después de 30 min. de reacción. Todavía en otro aspecto, la actividad de transgalactosilación relativa es superior a 12 después de 30 min. de reacción. En un aspecto, se proporciona un método, en donde el tratamiento con un polipéptido como se describe en este documento tiene lugar a una temperatura óptima para la actividad de la enzima. En otro aspecto, el polipéptido se añade al sustrato lácteo a una concentración de 0,01 a 1000 ppm. Aún en otro aspecto, el polipéptido se añade al sustrato lácteo a una concentración de 0,1 a 100 ppm. En otro aspecto, el polipéptido se añade al sustrato lácteo a una concentración de 1-10 ppm. En un aspecto, se proporciona un método que comprende además la fermentación de un sustrato tal como un producto lácteo con un microorganismo. En otro aspecto, el producto lácteo es yogur. En otro aspecto, el tratamiento con el polipéptido y el microorganismo se realiza esencialmente al mismo tiempo. En un aspecto, el polipéptido y el microorganismo se añaden al sustrato lácteo esencialmente al mismo tiempo. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende una célula o un polipéptido como se describe en la presente memoria. En un aspecto, el polipéptido definido en la presente memoria se añade en una concentración de 0,01 a 1000 ppm. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende un polipéptido inactivado como se define en la presente memoria. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende un polipéptido inactivado como se define en la presente memoria en una concentración de 0,01 a 1.000 ppm. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende GOS formado *in situ* por un polipéptido como se define en la presente memoria. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende una célula como se define en la presente memoria. Un producto lácteo tal como se describe en la presente memoria puede ser, p. ej., leche descremada, leche baja en grasa, leche entera, crema, leche UHT, leche con vida útil prolongada, un producto lácteo fermentado, queso, yogur, mantequilla, producto lácteo para untar, suero de leche, bebida de leche acidificada, crema agria, bebida a base de suero, helado, leche condensada, dulce de leche o una bebida con leche aromatizada. Un producto lácteo puede prepararse por cualquier método conocido en la técnica.
- Un producto lácteo puede comprender además componentes no lácteos, p. ej. componentes vegetales tales como, p. ej., aceite vegetal, proteína vegetal y/o hidratos de carbono vegetales. Los productos lácteos también pueden comprender más aditivos tales como, p. ej., enzimas, agentes aromatizantes, cultivos microbianos tales como cultivos probióticos, sales, edulcorantes, azúcares, ácidos, frutas, zumos de frutas o cualquier otro componente conocido en la técnica como un componente de, o aditivo para, un producto lácteo.
- En una realización de la invención, uno o más componentes de leche y/o fracciones de leche representan al menos el 50% (peso/peso), tal como al menos el 70%, p. ej., al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, del producto lácteo.
- En una realización de la invención, uno o más sustratos lácteos que han sido tratados con una enzima como se define en la presente memoria que tiene actividad transgalactosilante representan al menos 50% (peso/peso), tal como al menos 70%, p. ej. al menos 80% , preferiblemente al menos 90%, del producto lácteo.
- En una realización de la invención, el producto lácteo es un producto lácteo que no se enriquece por adición de galactooligosacáridos producidos previamente.
- En una realización de la invención, el sustrato lácteo tratado con polipéptido no se seca antes de ser utilizado como ingrediente en el producto lácteo.
- En una realización de la invención, el producto lácteo es helado. En el presente contexto, el helado puede ser cualquier tipo de helado tal como helado sin descremar, helado bajo en grasa o helado de yogur u otros productos lácteos fermentados. El helado puede fabricarse por cualquier método conocido en la técnica.
- En una realización de la invención, el producto lácteo es leche o leche condensada.
- En una realización de la invención, el producto lácteo es leche UHT. La leche UHT en el contexto de la presente invención es leche que ha sido sometida a un procedimiento de esterilización que está destinado a matar a todos los microorganismos, incluidas las esporas bacterianas. El tratamiento UHT (ultra alta temperatura) puede ser, p. ej., tratamiento térmico durante 30 segundos a 130°C, o tratamiento térmico durante un segundo a 145°C.
- En una realización preferida de la invención, el producto lácteo es leche ESL. Leche ESL en el presente contexto es la leche que tiene una vida útil prolongada debido a la microfiltración y/o el tratamiento térmico y que es capaz de permanecer fresca durante al menos 15 días, preferiblemente durante al menos 20 días, en el estante de la tienda a 2-5°C.
- En otra realización preferida de la invención, el producto lácteo es un producto lácteo fermentado, p. ej., yogur.

Los microorganismos utilizados para la mayoría de los productos lácteos fermentados se seleccionan del grupo de bacterias denominadas generalmente bacterias de ácido láctico. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "bacteria de ácido láctico" designa una bacteria gram-positiva, microaerófila o anaerobia, que fermenta azúcares con la producción de ácidos, incluidos el ácido láctico como ácido predominantemente producido, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias de ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran dentro del orden "Lactobacillales" que incluye *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pseudoleuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* y *Propionibacterium spp.*. Además, las bacterias productoras de ácido láctico pertenecientes al grupo de bacterias anaerobias, bifidobacterias, es decir, *Bifidobacterium spp.*, que se utilizan frecuentemente como cultivos alimentarios solas o en combinación con bacterias de ácido láctico, se incluyen generalmente en el grupo de bacterias de ácido láctico.

Las bacterias de ácido láctico se suministran normalmente a la industria láctea ya sea como cultivos congelados o liofilizados para propagación por iniciador en masa o como los llamados cultivos "Direct Vat Set" (DVS), destinados a la inoculación directa en un recipiente o cuba de fermentación para la producción de un producto lácteo fermentado. Dichos cultivos se denominan en general "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

Las cepas de bacterias de ácido láctico de cultivo iniciador usadas habitualmente se dividen generalmente en organismos mesófilos que tienen temperaturas óptimas de crecimiento a aproximadamente 30°C y organismos termófilos que tienen temperaturas óptimas de crecimiento en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C. Los organismos típicos que pertenecen al grupo mesófilo incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*, *Lactobacillus casei subsp. casei* y *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. Las especies bacterianas de ácido láctico termófilo incluyen como ejemplos *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

También las bacterias anaerobias pertenecientes al género *Bifidobacterium* incluidas *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium longum* se usan habitualmente como cultivos iniciadores para productos lácteos y generalmente se incluyen en el grupo de bacterias de ácido láctico. Además, las especies de *Propionibacterium* se utilizan como cultivos iniciadores para productos lácteos, en particular en la fabricación de quesos. Además, los organismos que pertenecen al género *Brevibacterium* se utilizan habitualmente como cultivos iniciadores para alimentos.

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

En una realización de la presente invención, el microorganismo utilizado para la fermentación del sustrato lácteo es *Lactobacillus casei* o una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

Los procesos de fermentación a utilizar en un método de la presente invención son bien conocidos y el experto en la técnica sabrá cómo seleccionar condiciones de proceso adecuadas, tales como temperatura, oxígeno, cantidad y características de microorganismo/s, aditivos tales como p. ej. hidratos de carbono, saborizantes, minerales, enzimas y tiempo de proceso. Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan de modo que apoyen la consecución de la presente invención.

Como resultado de la fermentación, el pH del sustrato lácteo se reducirá. El pH de un producto lácteo fermentado de la invención puede estar comprendido, p. ej., en el intervalo de 3,5 a 6, tal como en el intervalo de 3,5 a 5, preferiblemente en el intervalo de 3,8 a 4,8.

En un aspecto, se proporciona un método para usar los polipéptidos o usar uno o más de los tipos de células mencionados anteriormente para producir oligosacáridos. Los oligosacáridos comprenden, pero no se limitan a, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, isomaltoligosacáridos, maltoligosacáridos, lactosacarosa y xilooligosacáridos.

En una realización de la invención, los oligosacáridos se producen incubando la célula que expresa el polipéptido en un medio que comprende un sustrato disacárido tal como por ejemplo lactulosa, trehalosa, ramnosa, maltosa, sacarosa, lactosa o celobiosa. La incubación se lleva a cabo en condiciones en las que se producen oligosacáridos. Las células pueden ser parte de un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, complementos alimenticios y productos comestibles probióticos. Alternativamente, los oligosacáridos pueden recuperarse y posteriormente añadirse al producto de interés antes o después de su preparación.

En un aspecto, se proporciona el uso de una célula descrita en la presente memoria para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, producto de leche fermentado, complemento alimenticio y producto comestible probiótico.

- En un aspecto, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar productos de queso y en métodos para elaborar los productos de queso. Los productos de queso pueden seleccionarse, p. ej., del grupo que consiste en queso cremoso, requesón y queso fresco. Mediante la adición de polipéptidos los quesos pueden contener cantidades significativamente aumentadas de galactooligosacáridos y cantidades reducidas de lactosa. En un aspecto, las cantidades de lactosa en el producto de queso final pueden reducirse en al menos aproximadamente 25 por ciento, preferiblemente al menos aproximadamente 50 por ciento, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 75 por ciento. Los polipéptidos se pueden usar para reducir la lactosa en productos de queso a menos de aproximadamente 1 gramo por porción, una cantidad que puede ser tolerada por la mayoría de las personas intolerantes a la lactosa.
- Los productos de queso proporcionados en la presente invención son productos de queso nutricionalmente mejorados que tienen un aumento en el contenido de fibra soluble, un contenido calórico reducido, excelentes propiedades organolépticas, mejor textura y sabor. Además, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden reducir el índice glucémico de los productos de queso porque los GOS se absorben más lentamente que la lactosa o sus productos de hidrólisis. Por último, los polipéptidos pueden reducir el coste de producción de los productos de queso, en particular los productos de queso cremoso, debido a que los GOS proporcionan sorprendentemente una textura mejorada al producto de queso cremoso, permitiendo así el uso reducido de estabilizantes o permitiendo un aumento del contenido de humedad sin sinéresis.
- En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende un polipéptido como se describe en la presente memoria y un sustrato de hidrato de carbono. En otro aspecto, el sustrato de hidrato de carbono es un disacárido. En otro aspecto, el disacárido es por ejemplo lactulosa, trehalosa, ramnosa, maltosa, sacarosa, lactosa o celobiosa. En otro aspecto aún, el sustrato de hidrato de carbono es lactosa. La composición se prepara de manera que se producen oligosacáridos. El polipéptido como se describe en la presente memoria puede ser parte de un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, complementos alimenticios y productos comestibles probióticos. En un aspecto, se proporciona una composición que comprende un polipéptido como se describe en la presente memoria y un estabilizante. Ejemplos de estabilizantes son, p. ej., un poliol tal como, por ejemplo, glicerol o propilenglicol, un azúcar o un azúcar alcohol, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico (p. ej., un éster de borato aromático).
- En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido transgalactosilante como se describe en la presente memoria o una célula como se describe en la presente memoria, para producir galactooligosacáridos. En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido transgalactosilante como se describe en la presente memoria o una célula como se describe en la presente memoria, para producir galactooligosacáridos para formar parte de un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, complementos alimenticios y productos probióticos comestibles. En un aspecto, el producto es yogur, queso o productos lácteos fermentados. En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido transgalactosilante como se describe en la presente memoria o una célula como se describe en la presente memoria, para producir galactooligosacáridos para aumentar el crecimiento de *Bifidobacterium*. En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido transgalactosilante como se describe en la presente memoria o una célula como se describe en la presente memoria, para producir galactooligosacáridos para aumentar el crecimiento de *Bifidobacterium* en una fermentación de cultivo mixto.
- En un aspecto, se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido transgalactosilante como se describe en la presente memoria, que comprende cultivar una célula como se describe en la presente memoria en un medio de cultivo adecuado en condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido y recuperar el polipéptido resultante del cultivo. Se proporciona un procedimiento para producir galactooligosacáridos, que comprende poner en contacto un polipéptido como se describe en la presente memoria o una célula como se describe en la presente memoria con una solución láctea que comprende lactosa.
- La adición de oligosacáridos puede aumentar el crecimiento de *Bifidobacterium* solo o de *Bifidobacterium* en un cultivo mixto.
- El tratamiento de los productos lácteos con enzimas que convierten la lactosa en monosacáridos o GOS tiene varias ventajas. En primer lugar, los productos pueden ser consumidos por personas con intolerancia a la lactosa que de otro modo mostrarían síntomas tales como flatulencia y diarrea. En segundo lugar, los productos lácteos tratados con lactasa tendrán un dulzor mayor que los productos similares no tratados debido al mayor dulzor percibido de glucosa y galactosa en comparación con lactosa. Este efecto es particularmente interesante para aplicaciones tales como yogur y helado donde se desea un alto dulzor del producto final y esto permite una reducción neta de hidratos de carbono en el producto consumido. En tercer lugar, en la producción de helado a menudo se observa un fenómeno denominado arenado, cuando las moléculas de lactosa cristalizan debido a la relativa baja solubilidad de la lactosa. Cuando la lactosa se convierte en monosacáridos o GOS la sensación del helado en la boca es mucho mejor que en los productos no tratados. La presencia de una sensación arenosa debido a la cristalización de la lactosa puede eliminarse y los costes de la materia prima pueden disminuirse sustituyendo la leche desnatada en polvo por suero en polvo. Los principales efectos del tratamiento enzimático fueron el aumento del dulzor.
- En un aspecto, el o los polipéptido(s) transgalactosilante(s) tal como se describe en la presente memoria puede(n) usarse junto con otras enzimas tales como proteasas tales como quimosina o renina, lipasas tales como

fosfolipasas, amilasas, transferasas y lactasas. En un aspecto, el o los polipéptido(s) transgalactosilante(s) tal como se describe en la presente memoria pueden usarse junto con lactasa. Esto puede ser especialmente útil cuando existe el deseo de reducir la lactosa residual después del tratamiento con el o los polipéptido(s) transgalactosilante(s) como se describe en la presente memoria, especialmente a bajas concentraciones de lactosa.

5 Una lactasa en el contexto de la presente invención es cualquier glucósido hidrolasa con capacidad de hidrolizar el disacárido lactosa en monómeros constituyentes galactosa y glucosa. El grupo de lactasas comprende, pero no se limita a, enzimas asignadas a la subclase EC 3.2.1.108. Las enzimas asignadas a otras subclases, tales como, p. ej., EC 3.2.1.23, también pueden ser lactasas en el contexto de la presente invención. Una lactasa en el contexto de la invención puede tener otras actividades además de la actividad hidrolizante de lactosa, tal como por ejemplo una actividad transgalactosilante. En el contexto de la invención, la actividad hidrolizante de lactosa de la lactasa puede mencionarse como su actividad de lactasa o su actividad de beta-galactosidasa. Las enzimas que tienen actividad de lactasa a utilizar en un método de la presente invención pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano. Las enzimas preferidas se obtienen a partir de fuentes microbianas, en particular de un hongo filamentoso o levadura, o de una bacteria. La enzima puede proceder, p. ej., de una cepa de *Agaricus*, p. ej. *A. bisporus*; *Ascovaginospora*; *Aspergillus*, p. ej. *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*; *Candida*; *Chaetomium*; *Chaetotomastia*; *Dictyostelium*, p. ej. *D. discoideum*; *Kluveromyces*, p. ej. *K. fragilis*, *K. lactis*; *Mucor*, p. ej. *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, p. ej. *N. crassa*; *Rhizomucor*, p. ej. *R. pusillus*; *Rhizopus*, p. ej. *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, p. ej. *S. libertiana*; *Torula*; *Torulopsis*; *Trichophyton*, p. ej. *T. rubrum*; *Whetzelinia*, p. ej., *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, p. ej., *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. novalis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Bifidobacterium*, p. ej. *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*, p. ej. *C. freundii*; *Clostridium*, p. ej. *C. perfringens*; *Diplodia*, p. ej. *D. gossypina*; *Enterobacter*, p. ej. *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, p. ej. *E. herbicola*; *Escherichia*, p. ej. *E. coli*; *Klebsiella*, p. ej. *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothesium*; *Mucor*; *Neurospora*, p. ej. *N. crassa*; *Proteus*, p. ej. *P. vulgaris*; *Providencia*, p. ej. *P. stuartii*; *Pycnoporus*, p. ej., *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pycnoporus sanguineus*; *Ruminococcus*, p. ej. *R. torques*; *Salmonella*, p. ej. *S. typhimurium*; *Serratia*, p. ej. *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, p. ej. *S. flexneri*; *Streptomyces*, p. ej. *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. violeceoruber*; *Trametes*; *Trichoderma*, p. ej. *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, p. ej. *Y. enterocolitica*. En una realización, la lactasa es un componente intracelular de microorganismos como *Kluyveromyces* y *Bacillus*. *Kluyveromyces*, especialmente *K. fragilis* y *K. lactis*, y otros hongos como los de los géneros *Candida*, *Torula* y *Torulopsis*, son una fuente común de lactasas fúngicas, mientras que *B. coagulans* y *B. circulans* son fuentes bien conocidas de lactasas bacterianas. Están disponibles varios preparados comerciales de lactasa procedentes de estos organismos, tales como Lactozym® (disponible en Novozymes, Dinamarca), HA-Lactasa (disponible en Chr. Hansen, Dinamarca) y Maxilact® (disponible en DSM, Holanda), todos a partir de *K. lactis*. Todas estas lactasas se denominan lactasas neutras que tienen un pH óptimo entre pH 6 y pH 8. Cuando dichas lactasas se usan en la producción de, p. ej., yogur bajo en lactosa, el tratamiento enzimático tendrá que realizarse en una etapa independiente antes la fermentación o tendrán que utilizarse dosis enzimáticas bastante elevadas, porque su reducción de actividad como el pH disminuye durante la fermentación. Además, estas lactasas no son adecuadas para la hidrólisis de la lactosa en la leche realizada a alta temperatura, que en algunos casos sería beneficiosa para mantener el recuento microbiano bajo y garantizar de este modo la buena calidad de la leche.

40 En una realización, la enzima es una lactasa de una bacteria, p. ej. de la familia *Bifidobacteriaceae*, tal como del género *Bifidobacterium* tal como la lactasa descrita en el documento WO 2009/071539.

Materiales y procedimientos

Procedimiento 1

Producción de polipéptido

45 Los genes sintéticos diseñados para codificar el gen *Bifidobacterium bifidum* completo (1752 restos) con codones optimizados para la expresión en *Bacillus subtilis* se adquirieron de GeneART (Regensburg, Alemania) SEC ID N° 8.

Los mutantes por truncamiento de *Bifidobacterium bifidum* se construyeron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores inversos que permitieron la amplificación específica de la región seleccionada del gen sintético,

50 cebador directo: GGGGTAACTAGTGGAAGATGCAACAAGAAG (deleto subrayado) (SEQ ID n°: 15).

Cebadores inversos:

Mutante por truncamiento	Secuencia del cebador
BIF917 (SEQ ID nº: 9)	GCGCTTAATTAATTATTATGTTTTCTGTGCTTGTTT SEQ ID nº: 16
BIF995 (SEQ ID nº: 10)	GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTCATCAATCA SEQ ID nº: 17
BIF1068 (SEQ ID nº: 11)	GCGCTTAATTAATTATTGAACTCTAATTGTCGCTG SEQ ID nº: 18
BIF1241 (SEQ ID nº: 12)	GCGCTTAATTAATTATGTCGCTGTTTTCAGTTCAAT SEQ ID nº: 19
BIF1326 (SEQ ID nº: 13)	GCGCTTAATTAATTAATAATTCTTGTTCTGTGCCCA SEQ ID nº: 20
BIF1478 (SEQ ID nº: 14)	GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTCGCTTGCGC SEQ ID nº: 21

El gen sintético se clonó en el vector de expresión pBNspe *Bacillus subtilis* utilizando las secuencias de restricción únicas SpeI y PaeI (figura 1) y los plásmidos aislados se transformaron en la cepa BG3594 de *Bacillus subtilis*. Los transformantes se volvieron a rayar en placas LB que contenían 10 µg/ml de neomicina como selección.

- 5 Se preparó un precultivo en medio LB que contenía 10 µg/ml de neomicina y se cultivó durante 7 horas a 37°C y agitación a 180 rpm. Se utilizaron 500 µl de este precultivo para inocular 50 ml de medio modificado de Grant que contenía 10 µg/ml de neomicina, dejando cultivar durante 68 horas a 33°C y agitando a 180 rpm.

- 10 Las células se lisaron por adición directamente a los medios de cultivo de 1 mg/ml de Lisozima (Sigma-Aldrich) y 10 U/ml de concentraciones finales de Benzonasa (Merck) y se incubaron durante 1 hora a 33°C a 180 rpm. Los lisados se purificaron por centrifugación a 10.000 xg durante 20 minutos y posteriormente se filtraron de forma estéril.

El medio modificado de Grant se preparó según las siguientes instrucciones:

Parte I (Autoclave)

Soytone	10 g
Llevar a	500 ml por litro

Parte II

K ₂ HPO ₄ 1M	3 ml
Glucosa	75 g
Urea	3,6 g
10XMOPS de Grant	100 ml
Llevar a	400 ml por litro

Se preparó la parte I (2% p/p de Soytone) y se sometió al autoclave durante 25 minutos a 121°C. La parte II se preparó y se mezcló con la parte I y el pH se ajustó a pH 7,3 con HCl/NaOH.

- 15 El volumen se llevó a volumen completo y se esterilizó a través de un filtro PES de 0,22 µm.

Se preparó 10 x tampón MOPS según las siguientes instrucciones:

83,72 g	Tricina
7,17 g	Píldoras de KOH
12 g	NaCl
29,22 g	K ₂ SO ₄ 0,276 M

ES 2 650 444 T3

10 ml	MgCl ₂ 0,528 M
10 ml	100 X Micronutrientes de Grant

Llevar a aprox. 900 ml con agua y disolver. Ajustar el pH a 7,4 con KOH, llenar hasta 1 l y esterilizar la solución a través del filtro PES de 0,2 µm.

Se preparó 100 x Micronutrientes según las siguientes instrucciones:

Citrato sódico·2H ₂ O	1,47 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,47 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0,1 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,05 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 g
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0,1 g

Disolver y ajustar el volumen a 1 l con agua.

- 5 La esterilización fue a través de un filtro PES de 0,2 µm.

El almacenamiento fue a 4°C evitando la luz.

Método 2

Purificación y preparados enzimáticos

- 10 La cepa enzimática filtrada se concentró utilizando un dispositivo de ultrafiltración VivaSpin con un límite del PM de 10 kDa (Vivaspin 20, Sartorius, lote n° 12VS2004) y el concentrado se cargó en una columna de desalado PD10 (GE Healthcare, lote n° 6284601) y se eluyó en Tris-HCl 20 mM, pH 8,6. La cromatografía se realizó manualmente en un sistema FPLC de Äkta (GE Healthcare). Se cargaron 4 ml de la muestra desalada, que contenía aproximadamente 20 mg de proteína en una columna HyperQ de 2 ml (HyperCel™, Q sorbent) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 a un caudal de 1 ml/min. La columna se lavó en profundidad con 30 VC (volúmenes de columna) de tampón de lavado y la β-galactosidasa unida se eluyó con un gradiente largo de 100 CV en Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 NaCl 250 mM. Las impurezas restantes en la columna se eliminaron con una elución en una etapa utilizando Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 NaCl 500 mM. En la proteína en el flujo a través y elución se analizó la actividad de β-galactosidasa y por SDS-PAGE.

- 20 Se utilizaron geles de SDS-PAGE con el gel Bis-Tris 4-12% NuPage® Novex de Invitrogen 1,0 mm, 10 pocillos (Cat n° NP0321box), patrón previamente teñido See-Blue® Plus2 (Cat n° LC5925) y tampón corriente NuPAGE® MES SDS (Cat n° NP0002) según el protocolo del fabricante. Los geles se tiñeron con Simply Blue Safestain (Invitrogen, Cat #n° LC6060) (figura 2).

Método 3

Medición de la actividad β-galactosidasa

- 25 La actividad enzimática se midió utilizando el sustrato 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) (Sigma N1127) disponible en el mercado.

	ONPG sin receptor
100	mM KPO4 pH 6,0
12,3	mM ONPG

ONPG enriquecido con receptor

100	mM KPO4 pH 6,0
20	mM Celobiosa
12,3	mM ONPG

Solución STOP

10% de Na₂CO₃

- 5 Se añadieron 10 µl de series de dilución de enzima purificada en pocillos de placas de microvaloración que contenían 90 µl de tampón ONPG con o sin receptor. Las muestras se mezclaron y se incubaron durante 10 min a 37°C, posteriormente se añadieron 100 µl de solución STOP a cada pocillo para terminar la reacción. Las mediciones de absorbancia se registraron a 420 nm en un dispositivo Molecular Device SpectraMax platereader controlado por el paquete de programa informático Softmax.

La relación de actividad de transgalactosilación se calculó de la forma siguiente:

- 10 Relación de actividad de transgalactosilación = $(\text{Abs } 420^{+\text{Celobiosa}} / \text{Abs } 420^{-\text{Celobiosa}}) * 100$,
para diluciones en las que la absorbancia estaba comprendida entre 0,5 y 1,0 (figura 3).

Método 4

Determinación de la actividad de LAU

Principio:

- 15 El principio de este método analítico es que la lactasa hidroliza 2-o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) en 2-o-nitrofenol (ONP) y galactosa a 37°C. La reacción se interrumpe con el carbonato sódico y el ONP liberado se mide en espectrofotómetro o colorímetro a 420 nm.

Reactivos:

- 20 Tampón MES pH 6,4 (MES 100 mM pH 6,4, CaCl₂ 10 mM): Disolver 19,52 g de hidrato de MES (Pm: 195,2 g/mol, Sigma-Aldrich nº M8250-250G) y 1,470 g de dihidrato de CaCl₂ (Pm: 147,01 g/mol, Sigma-Aldrich) en 1.000 ml de H₂Odd, ajustar el pH a 6,4 con NaOH 10 M. Filtrar la solución a través de filtro de 0,2 µm y almacenar a 4°C hasta 1 mes.

- 25 Sustrato ONPG pH 6,4 (ONPG 12,28 mM, MES 100 mM pH 6,4, CaCl₂ 10 mM): Disolver 0,370 g de 2-o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG, Pm: 301,55 g/mol, Sigma-Aldrich nº N1127) en 100 ml de tampón MES pH 6,4 y almacenar en la oscuridad a 4°C durante un máximo de 7 días.

Interrumpir el reactivo (10% de Na₂CO₃): Disolver 20,0 g de Na₂CO₃ en 200 ml de H₂Odd, filtrar la solución a través de filtro de 0,2 µm y almacenar a T.A. hasta 1 mes.

Procedimiento:

- 30 Se hicieron series de dilución de la muestra enzimática en el tampón MES a pH 6,4 y se transfirieron 10 µl de cada dilución de muestra a los pocillos de una placa de microvaloración (formato de 96 pocillos) que contenía 90 µl de sustrato ONPG de pH 6,4. Las muestras se mezclaron y se incubaron durante 5 min a 37°C usando un Thermomixer (Comfort Thermomixer, Eppendorf) y posteriormente se añadieron 100 µl de reactivo Stop a cada pocillo para terminar la reacción. Se construyó un blanco usando tampón MES de pH 6,4 en lugar de la muestra enzimática. El aumento de la absorbancia a 420 nm se midió con un lector ELISA (SpectraMax platereader, Molecular Device)
- 35 frente al blanco.

Cálculo de la actividad enzimática:

- 40 Se determinó el coeficiente de extinción molar de 2-o-nitrofenol (Sigma-Aldrich nº 33444-25G) en tampón MES pH 6,4 ($0,5998 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Se definió una unidad (U) de actividad de lactasa (LAU) como la correspondiente a la hidrólisis de 1 nmol de ONPG por minuto. Utilizando placas de microvaloración con un volumen de reacción total de 200 µl (trayectoria de luz de 0,52 cm), la actividad de lactasa por ml de la muestra de enzima se puede calcular usando la siguiente ecuación:

$$LAU/ml \left(\frac{nmol}{min \cdot ml} \right) = \frac{Abs_{420} \times 200\mu l \times factor\ de\ diluci3n}{0,5998 \cdot 10^3 \cdot nM^{-1} \cdot cm^{-1} \times 0,52cm \times 5min \times 0,01ml}$$

Cálculo de la actividad específica para BIF917 mostrada en la presente memoria como SEQ ID nº: 1:

Determinación de la concentración de BIF917:

- 5 La cuantificación de la enzima diana (BIF917) y los productos de truncamiento se determinaron usando el sistema -PAGE sin Criterion Stain (BioRad). Se utilizó gel profundido 4-20% de Tris-HCl sin tinte de cualquier kD, 18 pocillos (Comb. Nº 345-0418) con un tampón Serva Tris-Glicina/SDS (BioRad cat. nº 42529). Se utilizaron geles con los siguientes parámetros: 200 V, 120 mA, 25 W, 50 min. Se utilizó BSA (1,43 mg/ml) (Sigma-Aldrich, nº de cat. 500-0007) como proteína patrón y se utilizó Criterion Stain Free Imager (BioRad) con el programa informático Image Lab (BioRad) para análisis cuantitativo usando intensidad de banda con correlación del contenido de triptófano.
- 10 La actividad específica LAU de BIF917 se determinó en fermento en bruto (concentrado de ultrafiltración) de dos fermentaciones independientes (como se describe en el método 1) y utilizando 5 diluciones diferentes (véase la tabla 1).

Se encontró que la actividad específica de BIF917 era 21,3 LAU/mg o 0,0213 LAU/ppm.

Tabla 1: Determinación de la actividad específica de BIF917

Identificación de muestras	Enzima	Fermentación	Factor de dilución	Actividad LAU/ml	Concentración de proteína (BIF917) mg/ml	Concentración de proteína (BIF917) ppm	Actividad específica LAU/mg	Actividad específica LAU/ppm
1	BIF 917	a	5	26,9	1,23	1.232	21,9	0,0219
2	BIF 917	a	10	53,9	2,44	2.437	22,1	0,0221
3	BIF 917	a	10	75,4	3,56	3.556	21,2	0,0212
4	BIF 917	a	20	163,9	7,78	7.778	21,1	0,0211
5	BIF 917	a	30	233,6	11,06	11.065	21,1	0,0211
6	BIF 917	b	5	30,26825	1,34	1.342	22,6	0,0226
7	BIF 917	b	10	55,91536	2,61	2.607	21,4	0,0214
8	BIF 917	b	10	76,96056	3,70	3.697	20,8	0,0208
9	BIF 917	b	20	156,986	7,75	7.755	20,2	0,0202
10	BIF 917	b	30	236,9734	11,45	11.452	20,7	0,0207
						Arg	21,3	0,0213
						Patrón	0,700976	0,000701

Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación de la actividad de β -galactosidasa de variantes de truncamiento BIF

- 5 Se construyeron ocho variantes de truncamiento diferentes: BIF_917, BIF_995, BIF_1068, BIF_1172, BIF_1241, BIF1326, BIF_1400 y BIF_1478 como se describe usando el método 1 y se purificaron como se describe en el método 2 (véase la figura 2).

Se determinó la actividad de β -galactosidasa de todas las variantes de truncamiento en presencia y ausencia de celobiosa usando el método 3 descrito anteriormente.

Resultados

- 10 Se calculó la relación de actividad de transgalactosilación $((\text{Abs}420^{+\text{Celobiose}}/\text{Abs}420^{-\text{Celobiose}}) * 100)$ a partir de la actividad de β - galactosidasa medida para cada variante y se muestra en la figura 3. Las variantes que tienen una longitud de 1.241 restos o menos muestran una relación de actividad de transgalactosilación superior al 100%, lo que indica que estas variantes son predominantemente transgalactosilantes. Las variantes con una longitud de más de 1.241 restos muestran una relación de actividad de transgalactosilación inferior al 100%, lo que indica que estas
- 15 variantes son predominantemente hidrolíticas. BIF_917 y BIF_995 tienen la proporción mayor de actividad de transgalactosilación alrededor del 250%.

Ejemplo 2

GOS generado en una matriz de yogur

- 20 La evaluación de las enzimas BIF en la producción de GOS se probó en una simulación de la aplicación de yogur. Ambos experimentos en lotes con un volumen de 100 μ l se realizaron en placas MTP de 96 pocillos usando una mezcla de yogur, consistente en 98,60% (p/v) de leche baja en grasa pasteurizada fresca (Mini-mælk, Arla Foods, Dinamarca) y 1,4% (p/v) de ingrediente de suero de leche Nutrilac YQ-5075 (Arla). Para hidratar completamente Nutrilac YQ-5075, la mezcla se dejó en agitación durante 20 horas y después se añadió fosfato Na 20 mM pH 6,5 para asegurar un pH de 6,5. Esta base de leche se usó pura y se determinó la concentración de lactosa que era de
- 25 5,5% (p/v), lo que corresponde a 5,3% (p/p) en esta solución. La siguiente correlación es válida en el presente ejemplo: lactosa al 1% (p/v) = 0,9587% (p/p) de lactosa. Se mezclaron 90 μ l de la base de leche con 10 μ l de las enzimas purificadas, se sellaron con cinta adhesiva y se incubaron a 43°C durante 3 horas. La reacción se interrumpió con 100 μ l de Na_2CO_3 al 10%. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Método de HPLC

- 30 El análisis cuantitativo de galactooligosacáridos (GOS), lactosa, glucosa y galactosa se realizó por HPLC. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un Dionex ICS 3000. Los parámetros del IC fueron los siguientes: Fase móvil: NaOH 150 mM, caudal: Isocrático, 0,25 ml/min, columna: Carbowax PA1, temperatura de la columna: T.A., volumen de inyección: 10 μ l, detector: PAD, integración: manual, preparación de la muestra: dilución de 100 veces en agua Milli-Q (0,1 ml de muestra + 9,9 ml de agua) y filtración a través de filtros de jeringuilla de 0,45 μ m, cuantificación:
- 35 áreas de los picos en porcentaje de área del pico del patrón. Se utilizó un jarabe de GOS (Vivanal GOS, Friesland Campina) como patrón para la cuantificación de GOS. En este ejemplo, el término "GOS" se define como galactooligosacáridos con un grado de polimerización (GP) de 3 o superior.

Resultados

- 40 La cantidad cuantificada de GOS generada en la base de leche por BIF_917, BIF_995 y BIF_1326 se muestra en la figura 4. Se puede ver que las variantes más cortas BIF_917 y BIF_995 tienen una producción de GOS (determinada por una prueba de la T de Student con 95% de confianza) significativamente mayor alrededor del 1,2% (p/v) en comparación con BIF_1326 que genera menos del 0,1% (p/v).

Ejemplo 3

Modelo de degradación de variantes de truncamiento

- 45 Se ordenó una biblioteca que cubría la región entre BIF1230 y BIF1325 de GeneART (Regensburg, Alemania) (véase la tabla 2). Las variantes de truncamiento se produjeron como se describe en el método 1. Los péptidos resultantes se sometieron a análisis SDS_PAGE y se visualizaron con Simply Blue Safestain (Invitrogen, Cat nº LC6060) (figura 5).

Resultados

- 50 Sorprendentemente, la mayoría de las variantes se modificaron mediante proteólisis en el caldo final con cantidades variables de banda diana que aparecen al final de la fermentación. Las variantes generaron tres bandas distintas con

intensidades variables que se verificaron mediante espectrometría de masas. Las variantes tienen truncamiento en el terminal C con BIF917 correspondiente a los extremos de la SEQ ID n°: 1, BIF995 correspondientes a los extremos de SEQ ID n°: 2 y BIF1068 correspondientes a los extremos de la SEQ ID n°: 3.

- 5 Las bandas de proteínas cortadas del gel (marcadas con flechas en la figura 5) se digieren utilizando tres enzimas diferentes, como preparación para el análisis de espectrometría de masas. La tripsina hidroliza los enlaces peptídicos específicamente en el lado carboxilo de los restos de arginina (R) y lisina (K) excepto cuando una prolina (P) está en el lado carboxilo. La α -quimotripsina hidroliza enlaces peptídicos específicamente en el lado carboxilo de la tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W) y leucina (L) excepto cuando una prolina (P) está en el lado carboxilo. Glu-C escinde preferentemente en el lado carboxilo de glutamilo (E) en tampón de bicarbonato de amonio pH 8, pero también escinde en el lado carboxilo de aspartilo (D) si la hidrólisis se lleva a cabo en un tampón de fosfato pH 8.

- 10 Con el fin de detectar el terminal C, la proteína de interés se prepara para su análisis utilizando el procedimiento básico de los inventores para caracterización de proteínas (A2963), con un cambio que utiliza 40% de ^{18}O -agua en el tampón de digestión. La teoría es que la escisión proteolítica incorporará tanto ^{18}O -agua como ^{16}O -agua en los péptidos resultantes, que consecuentemente aparecerán como dobletes. El terminal C de la proteína, aunque sólo aparecerá como un único péptido con ^{16}O -agua, ya que no está escindido, sino sólo el "último péptido" a la izquierda de la proteína. De esta manera, el terminal C se cartografía usando análisis MS/MS.

Tabla 2:

Variantes		
Nombre	Fragmento de SEQ ID n°: 6	Pocillo
BIF1230	1 1.201	A01
BIF1.231	1 1.202	B01
BIF1232	1 1.203	C01
BIF1233	1 1.204	
BIF1234	1 1.205	
BIF1235	1 1.206	D01
BIF1236	1 1.207	
BIF1237	1 1.208	E01
BIF1238	1 1.209	F01
BIF1239	1 1.210	G01
BIF1240	1 1.211	A02
BIF1241	1 1.212	B02
BIF1242	1 1.213	C02
BIF1243	1 1.214	
BIF1244	1 1.215	E02
BIF1245	1 1.216	F02
BIF1246	1 1.217	G02
BIF1247	1 1.218	H02
BIF1248	1 1.219	A03

ES 2 650 444 T3

Variantes		
Nombre	Fragmento de SEQ ID nº: 6	Pocillo
BIF1249	1 1.220	B03
BIF1250	1 1.221	C03
BIF1251	1 1.222	D03
BIF1252	1 1.223	E03
BIF1253	1 1.224	
BIF1254	1 1.225	F03
BIF1255	1 1.226	G03
BIF1256	1 1.227	H03
BIF1257	1 1.228	A04
BIF1258	1 1.229	B04
BIF1259	1 1.230	C04
BIF1260	1 1.231	D04
BIF1261	1 1.232	
BIF1262	1 1.233	E04
BIF1263	1 1.234	F04
BIF1264	1 1.235	G04
BIF1265	1 1.236	H04
BIF1266	1 1.237	A05
BIF1267	1 1.238	B05
BIF1268	1 1.239	C05
BIF1269	1 1.240	D05
BIF1270	1 1.241	E05
BIF1271	1 1.242	F05
BIF1272	1 1.243	G05
BIF1273	1 1.244	H05
BIF1274	1 1.245	A06
BIF1275	1 1.246	B06
BIF1276	1 1.247	C06
BIF1277	1 1.248	D06

ES 2 650 444 T3

Variantes		
Nombre	Fragmento de SEQ ID nº: 6	Pocillo
BIF1278	1 1.249	E06
BIF1279	1 1.250	
BIF1280	1 1.251	F06
BIF1281	1 1.252	G06
BIF1282	1 1.253	H06
BIF1283	1 1.254	A07
BIF1284	1 1.255	
BIF1285	1 1.256	
BIF1286	1 1.257	
BIF1287	1 1.258	B07
BIF1288	1 1.259	
BIF1289	1 1.260	C07
BIF1290	1 1.261	D07
BIF1291	1 1.262	
BIF1292	1 1.263	E07
BIF1293	1 1.264	
BIF1294	1 1.265	
BIF1295	1 1.266	F07
BIF1296	1 1.267	G07
BIF1297	1 1.268	
BIF1298	1 1.269	H07
BIF1299	1 1.270	A08
BIF1300	1 1.271	B08
BIF1301	1 1.272	C08
BIF1302	1 1.273	D08
BIF1303	1 1.274	E08
BIF1304	1 1.275	F08
BIF1305	1 1.276	G08
BIF1306	1 1.277	H08

Variantes		
Nombre	Fragmento de SEQ ID nº: 6	Pocillo
BIF1307	1 1.278	A09
BIF1308	1 1.279	B09
BIF1309	1 1.280	
BIF1310	1 1.281	
BIF1311	1 1.282	
BIF1312	1 1.283	C09
BIF1313	1 1.284	
BIF1314	1 1.285	
BIF1315	1 1.286	D09
BIF1316	1 1.287	E09
BIF1317	1 1.288	F09
BIF1318	1 1.289	G09
BIF1319	1 1.290	H09
BIF1320	1 1.291	A10
BIF1321	1 1.292	B10
BIF1322	1 1.293	C10
BIF1323	1 1.294	D10
BIF1324	1 1.295	E10
BIF1325	1 1.296	F10

Ejemplo 4

GOS generados por vía enzimática *in situ* en base de leche y yogures

En este ejemplo, el término "GOS" se define como galactooligosacáridos con un grado de polimerización (GP) de 3 o superior.

- 5 La evaluación de la producción de GOS por BIF917 y BIF995 se ensayó mediante aplicación *in situ* en diferentes yogures al estilo balcánico. La β -galactosidasa se añadió a la base de leche a la vez que la adición de los cultivos de yogur específicos, dando como resultado la reacción de transgalactosilación que se ejecuta junto con el proceso de fermentación del yogur.

- 10 Los experimentos iniciales de lotes de yogur (estilo balcánico) se realizaron con una base de leche de 100 ml (mezcla de yogur). La base de leche consistió en 98.60% (p/v) de leche convencional pasteurizada fresca (no orgánica) baja en grasa (Mini-mælk 0,5% de grasa, Arla Foods Amba, Dinamarca) y 1,4% (p/v) de ingrediente de suero Nutrilac YQ-5075 (Arla Foods Ingredients, Dinamarca), dando como resultado una concentración de lactosa del 5,5% (p/v), correspondiente a 5,3% (p/p) de lactosa al 1% (p/v) = 0,9587% (p/p) en esta solución). Para hidratar completamente Nutrilac YQ-5075, la mezcla se dejó en agitación suave durante 20 horas a 4°C. En el experimento
- 15 inicial se usó un cultivo YO-MIX 485LYO liofilizado consistente en *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (DuPont Nutrition Biosciences, Dinamarca). Se preparó una dilución inicial del cultivo, añadiendo 10 g de YO-MIX 485LYO a 400 ml de leche UHT convencional (no orgánica) (Let-mælk 1,5% de grasa,

Arla Foods Amba, Dinamarca). Se añadieron 1,43 ml del cultivo diluido por litro de base de leche. 100 ml de base de leche se distribuyeron en botellas con tapa azul de 250 ml y se añadieron enzimas en concentraciones variables (10, 20 y 40 ppm, correspondientes a 0,213, 0,426 y 0,853 LAU como se describe en el método 4) 1% de constitución (v/v) de la mezcla de yogur final. La fermentación con yogur se realizó a 43°C y terminó después de 10 h por enfriamiento rápido en hielo. Las fermentaciones se realizaron siempre en duplicados y la composición de azúcar/oligosacáridos del yogur se analizó por HPLC el día después de la fermentación (véase el método de HPLC más adelante). Las muestras de yogur fermentado se almacenaron siempre a 4°C.

Los resultados del experimento inicial de yogur se muestran en la tabla 3. Puede observarse que el aumento de la dosis de BIF917 o BIF995 de 10 ppm a 40 ppm lleva a un aumento del contenido de GOS y una disminución de la cantidad de DP2 (incluida la lactosa) en el yogur final. La diferencia en el rendimiento de las dos variantes está dentro de la variancia de la determinación por HPLC y se puede concluir que tienen un comportamiento similar dentro de las dosificaciones investigadas.

Tabla 3. Contenido de sacáridos DP2 (principalmente lactosa) y GOS (DP3 +) en un yogur fermentado tratado con dosis crecientes de BIF917 y BID995. Todos los resultados se calculan como un promedio de tres mediciones independientes.

		Cantidad p/v% DP2 incl. Lactosa	Patrón	Cantidad p/v% GOS (DP3 +)	Patrón
Yogur	BIF917_10 ppm	2,191	0,092	1,249	0,051
	BIF917_20 ppm	1,296	0,047	1,882	0,056
	BIF917_40 ppm	0,970	0,019	2,346	0,047
	BIF995_10ppm	2,787	0,139	1,158	0,035
	BIF995_20ppm	1,494	0,075	1,649	0,082
	BIF995_40ppm	0,931	0,028	2,392	0,063
	H ₂ O	4,219	0,127	0,000	0,000
Base de leche		5,500	0,156	0,000	0,000

Se preparó un yogur al estilo balcánico con una concentración inicial de lactosa de 7,5% p/v (correspondiente al 7,1% p/p, como lactosa al 1% p/v = 0,9423% p/p en esta solución) para investigar su efecto sobre la concentración de GOS alcanzada en el yogur final. Se aplicó el siguiente procedimiento:

1. Se mezclan todos los ingredientes en polvo (enumerados en la tabla 4) y la mezcla anhidra se añade a la leche/agua con buena agitación a 4-5°C, se deja hidratar durante 20 horas a 4°C.
2. La base de leche se precalienta a 65°C (P1)
3. La base de leche se homogeneiza a 65°C/200 bar
4. La base de leche se pasteuriza a 95°C durante 6 minutos (P3)
5. La base de leche se enfría a 5°C (K2)

Tabla 4. Lista de ingredientes de yogur al estilo balcánico en % (p/p)

Ingredientes en % (p/p)	
Nombre del ingrediente	
Leche desnatada (Skummet-mælk 0,1% de grasa, Arla Foods Amba, Dinamarca)	93,533
Crema 38% de grasa (Arla Foods Amba, Dinamarca)	1,067
Nutrilac YQ5075 (Arla Foods Ingredients, Dinamarca)	1,400

Ingredientes en % (p/p)	
Nombre del ingrediente	
Lactosa (Variolac® 992 BG100, Arla Foods Amba, Dinamarca)	3,000
Enzima/H2O	1,000
Total%	100

A continuación, la base de leche se calienta a 43°C (K1). La dilución del cultivo YO-MIX 495 consistente en *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (DuPont Nutrition Biosciences, Dinamarca) se realizó a la temperatura de fermentación. 250 ml de la base de leche se distribuyeron en botellas con tapa azul de 500 ml y se añadieron enzimas en constitución de concentración variable 1% (v/v) de la mezcla final de yogur. El cultivo iniciador, YO-Mix 495, se añadió a una dosis de 20 DCU (Unidades de cultivo Danisco) por 100 litros, donde una DCU es de 100 mil millones de células medidas como unidades formadoras de colonias. Para cada ensayo se prepararon tres muestras. La fermentación se llevó a cabo a pH 4,6 a 43°C y después se interrumpió por enfriamiento rápido a 5°C. La composición de azúcar/oligosacáridos en el yogur se analizó por HPLC el día después de la fermentación (véase el método de HPLC más adelante). Las muestras de yogur fermentado se almacenaron siempre a 4°C.

Los resultados del experimento en yogur se muestran en la tabla 5. Se puede observar que una lactosa inicial más alta (7,5% p/v) aumentaba el GOS total generado en el yogur en comparación con el GOS conseguido con 5,5% (p/v) de lactosa inicial, como se muestra en la tabla 3. Se alcanza una concentración final de GOS de 2,954% con la dosis de 50 ppm de BIF917 probada, mientras que se produjo 2,662% de GOS con 25 ppm de BIF917. En comparación, la β -galactosidasa hidrolizante convencional de *Kluyveromyces lactis* (GODO-YNL2, GODO SHUSEI Co., Ltd., Japón) produjo 0,355% de GOS a una dosis de 25 ppm. Se observó una disminución en la concentración de lactosa de 2.127% en el blanco de yogur, donde se añadió la misma cantidad de H₂O en lugar de enzima.

Tabla 5. Contenido de sacáridos DP2 (principalmente lactosa) y GOS (DP3+) en un yogur fermentado tratado con dosis crecientes de BIF917 y β -gal de *K. lactis*.

		Cantidad % p/v DP2 incl. lactosa	Patrón	Cantidad % p/v DP3 + (GOS)	Patrón
Yogur	BIF917_12,5 ppm	3,295	0,224	1,525	0,197
	BIF917_25 ppm	2,090	0,045	2,662	0,003
	BIF917_50 ppm	1,395	0,090	2,954	0,202
	β -Gal_de <i>K. lactis</i> 25ppm	0,425	0,040	0,355	0,006
	H ₂ O	5,431	0,099	0,000	0,000
Base de leche	H ₂ O	7,558	0,265	0,000	0,000

Para probar la influencia de la acidificación en la fermentación del yogur en BIF917 se realizaron estudios de rendimiento con tres cultivos diferentes de YO-mix, todos constituidos por *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (DuPont Nutrition Biosciences, Dinamarca): YO-MIX 495 con un tiempo relativo de fermentación lenta; YO-MIX 495 con un tiempo relativo de fermentación rápida y YO-MIX 601 con fase log prolongada y una fermentación acidificante fuerte. Todas las fermentaciones se realizaron a 43°C con la misma cantidad de BIF917 (25 ppm).

Además de ensayar la influencia de la temperatura en el rendimiento de BIF917, la fermentación con YO-MIX 495 y 25 ppm de BIF917 se llevó a cabo a 43°C, 45°C y 47°C.

El siguiente procedimiento se aplicó para producir yogures al estilo balcánico con una concentración inicial de lactosa del 7,5% (p/v) (correspondiente al 7,1% p/p, como 1% p/v de lactosa = 0,9423% p/p en esta solución):

1. Se mezclan todos los ingredientes en polvo (enumerados en la tabla 6) y la mezcla seca se añade a la leche/agua bajo buena agitación a 4-5°C, se deja hidratar durante 20 horas a 4°C.

2. La base de leche se precalienta a 65°C (P1)

3. La base de leche se homogeneiza a 65°C/200 bar
4. La base de leche se pasteuriza a 95°C durante 6 minutos (P3)
5. La base de leche se enfría a 5°C (K2)
6. La base de leche se calienta a 43°C (K1). La dilución de los cultivos YO-MIX 495, 485 y 601 (DuPont Nutrition Biosciences, Dinamarca) se realizó a la temperatura de fermentación.
7. Se distribuyeron 100 ml de base de leche en botellas con tapa azul de 250 ml y se añadieron enzimas en constitución de concentración variable 1% (v/v) de la mezcla de yogur final.
8. El cultivo iniciador, ya sea YO-Mix 495, 485 o 601 se añadió en una dosis de 20 DCU (Danisco Culture Units) por 100 litros. Para cada ensayo se prepararon tres muestras.
9. La fermentación se llevó a cabo a pH 4,6 a 43°C (para estudios de temperatura a 43°C, 45°C y 47°C respectivamente) y después se interrumpió por enfriamiento rápido a 5°C.
10. La composición de azúcar/oligosacáridos del yogur se analizó por HPLC el día después de la fermentación (véase el método de HPLC más adelante). Las muestras de yogur fermentado se almacenaron siempre a 4°C.

Tabla 6. Lista de ingredientes de yogur al estilo balcánico en % (p/p)

Ingredientes en % (p/p)	
Nombre del ingrediente	
Leche desnatada (Skummet-mælk 0,1% de grasa, Arla Foods Amba, Dinamarca)	93,533
Crema 38% de grasa (Arla Foods Amba, Dinamarca)	1,067
Nutrilac YQ5215 (Arla Foods Ingredients, Dinamarca)	1,400
Lactosa (Variolac® 992 BG100, Arla Foods Amba, Dinamarca)	3,000
Enzima/H ₂ O	1,000
Total %	100

- 15 Los resultados del experimento en yogur se muestran en la tabla 7. Puede observarse que los diferentes cultivos YO-mix, que tienen diferentes perfiles de acidificación, no ejercen ningún efecto significativo sobre el rendimiento final de GOS. Por término medio se genera 3,22% de (p/v) de GOS y la concentración de GOS más alta (3,300%) encontrada en el yogur producida con YO-mix 485 está dentro de la variancia de cuantificación. El cambio en la temperatura de fermentación de 43°C a 45°C y 47°C no cambia significativamente (utilizando una prueba de la T de Student con límites de confianza del 95%) la cantidad de GOS producida en cualquiera de los yogures: 3,258% p/v a 43°C, 3,375% p/v a 45°C y 3,236% p/v a 47°C. Por lo tanto, se puede concluir que la acción de BIF917 en las condiciones investigadas son robustas para la generación *in situ* de GOS en yogur empleando diversas condiciones de cultivo y temperatura.
- 20

Tabla 7. Contenido de DP2, DP3, DP4, DP5, DP6, glucosa y galactosa en un yogur fermentado tratado con BIF917.

muestra	Dosis de enzima	Cultivo de fermentación	Temperatura de fermentación	Lactosa Cantidad % p/v	Glucosa Cantidad % p/v	galactosa Cantidad % p/v	DP3 (GOS) Cantidad % p/v	DP4 (GOS) Cantidad % p/v	DP5 (GOS) Cantidad % p/v	DP6 (GOS) Cantidad % p/v	DP3+ (GOS) Cantidad % p/v
Base de leche				7,259	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
yogur	BIF917_25ppm	YM 495	43°C	5,466	0,000	0,448	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	BIF917_25ppm	YM 495	43°C	1,770	1,368	0,648	2,067	0,793	0,260	0,074	3,194
	BIF917_25ppm	YM 485	43°C	1,860	1,259	0,609	2,065	0,830	0,302	0,103	3,300
	BIF917_25ppm	YM 601	43°C	1,712	1,418	0,832	2,094	0,780	0,248	0,068	3,189
	BIF917_25ppm	YM 495	43°C	1,761	1,344	0,642	2,086	0,813	0,275	0,084	3,258
	BIF917_25ppm	YM 495	45°C	1,838	1,323	0,625	2,128	0,848	0,301	0,099	3,375
	BIF917_25ppm	YM 495	47°C	1,739	1,406	0,722	2,106	0,799	0,257	0,074	3,236
Patrón											
Base de leche				0,252	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
yogur	BIF917_25ppm	YM 495	43°C	0,225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	BIF917_25ppm	YM 495	43°C	0,075	0,067	0,039	0,080	0,031	0,010	0,002	0,123
	BIF917_25ppm	YM 485	43°C	0,090	0,063	0,015	0,084	0,033	0,012	0,008	0,136
	BIF917_25ppm	YM 601	43°C	0,013	0,014	0,017	0,018	0,010	0,006	0,002	0,037
	BIF917_25ppm	YM 495	43°C	0,042	0,031	0,014	0,046	0,016	0,005	0,001	0,067
	BIF917_25ppm	YM 495	45°C	0,071	0,050	0,013	0,061	0,028	0,012	0,007	0,108
	BIF917_25ppm	YM 495	47°C	0,009	0,015	0,004	0,003	0,002	0,003	0,003	0,011

Método de HPLC

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica. D-(+)-Lactosa (min 99%, n° 17814), D-(+)-glucosa (min 99,5%, n° G8270-100G, lote n° 036K0137) y D-(+)-galactosa (min 99 %, n° G0750-25G, lote n° 031M0043V) se adquirieron en Sigma (St. Louis, Mo, EE.UU.). Vivinal GOS Syrup (Prod. n° 502675 Lote n° 649566) se adquirió en Friesland Campina Domo (Amersfoort, Holanda) que contenía 57% de materia seca (MS) de

galactooligosacáridos, 21% de MS de lactosa anhidra, 20% de MS de glucosa anhidra y 0,8% de MS de galactosa anhidra.

Preparación de la muestra

- 5 Todos los patrones: Lactosa, glucosa, galactosa y GOS se prepararon en agua destilada doble (H₂O_{dd}) y se filtraron a través de filtros de jeringuilla de 0,45 µm. Se preparó un conjunto de cada patrón que oscila en concentración de 10 a 200.000 ppm.

- 10 Para evaluar la cuantificación del conjunto de azúcares anterior en una matriz de yogur/leche, los patrones anteriores se inyectaron en una muestra de leche y yogur como referencias internas. Todas las muestras de leche y yogur que contenían β-galactosidasa activa se inactivaron calentando la muestra a 95°C durante 10 min. Todas las muestras de leche se prepararon en placas de MTP de 96 pocillos (Corning, NY, EE.UU.), se diluyeron al menos 20 veces y se filtraron a través de filtros de placa de 96 pocillos de 0,20 µm antes del análisis (placa de filtro Corning, membrana hidrófila PVDF, NY, EE.UU.). Las muestras que contenían más de 50.000 ppm (5% p/v) de lactosa se calentaron a 30°C para asegurar una disolución adecuada. Todas las muestras de yogur se pesaron y diluyeron 10 veces en H₂O_{dd} antes de la homogeneización de la muestra utilizando af Ultra turrax TP18/10 durante unos minutos
- 15 (Janke y Kunkel lka-laborstechnik, Bie & Berntsen, Dinamarca). La β-galactosidasa se inactivó por tratamiento térmico y las muestras se diluyeron más en placas de MTP de 96 pocillos filtradas a través de filtros de 0,20 µm antes del análisis (placa filtrante Corning, membrana hidrófila PVDF, NY, EE.UU.). Todas las muestras se analizaron en placas de MTP de 96 pocillos selladas con cinta.

Instrumentación

- 20 El análisis cuantitativo de galactooligosacáridos (GOS), lactosa, glucosa y galactosa se realizó por HPLC. El análisis de muestras se llevó a cabo en un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) equipado con una bomba analítica de doble gradiente DGP-3600SD, un muestreador automático termostatzado WPS-3000TSL, un horno de columna termostática TCC-3000SD y un detector de índice de refracción RI-101 (Shodex, JM Science). El programa informático del sistema de datos de Chromeleon (Versión 6.80, DU10A Build 2826, 171948) se utilizó
- 25 para la adquisición y análisis de datos.

Condiciones cromatográficas

- 30 Las muestras se analizaron por HPLC utilizando una columna de oligosacáridos RSO, Ag⁺ 4% reticulada (Phenomenex, Holanda) equipado con una columna analítica de protección (Carbo-Ag⁺ neutral, AJ0-4491, Phenomenex, Holanda) a 70°C. La columna se eluyó con agua doblemente destilada (filtrada a través de una membrana de celulosa regenerada de 0,45 µm y purgada con gas helio) a un caudal de 0,3 ml/min.

- 35 Se mantuvo un caudal isocrático de 0,3 ml/min durante todo el análisis con un tiempo total de ejecución de 37 min y el volumen de inyección se ajustó a 10 µl. Las muestras se mantuvieron a 30°C en el compartimiento del muestreador automático termostatzado para asegurar la disolución de la lactosa. El eluyente se controló por medio de un detector de índice de refracción y se realizó la cuantificación se hizo por el área del pico con relación al área del pico del patrón dado. Los picos con un grado de tres o superior (DP³⁺) en el jarabe Vivinal GOS (Friesland Food Domo, Holanda) se utilizaron como patrón para el análisis cuantitativo de GOS después de la declaración de las producciones sobre el contenido de GOS en el producto.

Lista de secuencias

>SEQ ID N°: 1 (BIF_917)

- vedatrsdsttqmsstpevvysavdskqnrtsfddanwkwfmlsdsqvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwygsg
iyrdrvltvtdgvhvgngngvaiktpslatqnggdvtmnltkvandteaaanilkqtvfpkkgktdaigtvttasksiaagasadv
stitaaspklwsknlpnlytvrtevinggkvldtydteygrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlvggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtgydnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnasvawgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtsggavgswpknsyfgivdtagfpkdyfyqsqwddvhtlhlpawnnenvaksgnnpvvpvyttdaakvklyft
pkgsteklrigesftkkttaagytyqvyegskdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaak
lkadadrktitadgkdsyievdvtdanghivpdaanrvtdvkgagklvgvndngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeag
40 eitvtakadglqsstvkattavpgtstekt

>SEQ ID N°: 2 (BIF_995)

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtstfdanwfkmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
 ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygysspfsdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
 iyrdvtltvtdgvhvgngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaigtvttaskiaagasadv
 stitaasplksiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfdatsgfsIngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
 qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnaviggdktetwakfdltstinrdr
 napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
 nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
 pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdyfyysqwnddvhtlhlipawnenvvaksgnnpvvyvtdaakvklyft
 pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgkaak
 lkadadrktitadgkdsyievdvtdanghivpdaanrvtdvkgagklvgvndngsspdhdsyqadnrkafsgkvlavqstkeag
 eitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektrsfyysrnyyvtgtnkpiipsdvevrysdgtsdrqnvtdavsdqakagsfsva
 gtvagqkisrvrtmideigal

>SEQ ID N°: 3 (BIF_1068)

Vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtstfdanwfkmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
 ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygysspfsdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
 iyrdvtltvtdgvhvgngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaigtvttaskiaagasadv
 stitaasplksiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfdatsgfsIngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
 qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnaviggdktetwakfdltstinrdr
 napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
 nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
 pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdyfyysqwnddvhtlhlipawnenvvaksgnnpvvyvtdaakvklyft
 pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgkaak
 lkadadrktitadgkdsyievdvtdanghivpdaanrvtdvkgagklvgvndngsspdhdsyqadnrkafsgkvlavqstkeag
 eitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektrsfyysrnyyvtgtnkpiipsdvevrysdgtsdrqnvtdavsdqakagsfsva
 gtvagqkisrvrtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfahwtkpadtyntagtkvpgtatvfgkefkvt
 atirvq

5 >SEQ ID N°: 4 (BIF_1172)

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtstfdanwfkmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
 ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygysspfsdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
 iyrdvtltvtdgvhvgngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaigtvttaskiaagasadv
 stitaasplksiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfdatsgfsIngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
 qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnaviggdktetwakfdltstinrdr
 napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
 nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
 pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdyfyysqwnddvhtlhlipawnenvvaksgnnpvvyvtdaakvklyft
 pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasvtttgkaak
 lkadadrktitadgkdsyievdvtdanghivpdaanrvtdvkgagklvgvndngsspdhdsyqadnrkafsgkvlavqstkeag
 eitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektrsfyysrnyyvtgtnkpiipsdvevrysdgtsdrqnvtdavsdqakagsfsva
 gtvagqkisrvrtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfahwtkpadtyntagtkvpgtatvfgkefkvt
 atirvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdltidaikdgsttdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqiv
 myffrdsnavrfpdagktiki

>SEQ ID N°: 5 (BIF_1241)

vedatrsdsttqmsstpevvysavdskqrtsdfdanwkmfmsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
 ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
 iyrdrvltvtdgvhvgngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanltkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadv
 stitaasplwsiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfdatsgfsIngekvklkgvsmhhdqsglgavanrraierqveil
 qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlpggdkdetwakfdltstinrdr
 napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
 nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
 pwngtgsgavgswwpspknsyfgivdtagfkdtyyfyqsqwnddvhlhilpawnenvvaksgnnpvvyttdaakvlyft
 pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsddstahknmyltnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaak
 lkadadrktitadgkdsyievdtdanghivpdaanrvtdvkgagklvgvndngsspdhdsyqadnrkafsgkvlavqstkeag
 eitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektvrsfyysrnyyvtgtnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtdavsdqakagsfsva
 gtvagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfahwtkpadtyvntagtkvpgtatvfgkefkvt
 atirvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtdaikdgsttdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqiv
 myffrdsnavrfpdagtkkiqisadgknwtdlaaetiaaqessdrvpytydfapvgatfvkvtvtnadtttsgvvcaglteielt
 at

>SEQ ID N°: 6 (BIF_1326)

vedatrsdsttqmsstpevvysavdskqrtsdfdanwkmfmsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
 ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
 iyrdrvltvtdgvhvgngngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanltkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadv
 stitaasplwsiknplytvrtevlnggkvldtydteygrwtgfdatsgfsIngekvklkgvsmhhdqsglgavanrraierqveil
 qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlpggdkdetwakfdltstinrdr
 napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
 nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydsavwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
 pwngtgsgavgswwpspknsyfgivdtagfkdtyyfyqsqwnddvhlhilpawnenvvaksgnnpvvyttdaakvlyft
 pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsddstahknmyltnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaak
 lkadadrktitadgkdsyievdtdanghivpdaanrvtdvkgagklvgvndngsspdhdsyqadnrkafsgkvlavqstkeag
 eitvtakadglqsstvkiaattavpgtstektvrsfyysrnyyvtgtnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtdavsdqakagsfsva
 gtvagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfahwtkpadtyvntagtkvpgtatvfgkefkvt
 atirvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtdaikdgsttdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqiv
 myffrdsnavrfpdagtkkiqisadgknwtdlaaetiaaqessdrvpytydfapvgatfvkvtvtnadtttsgvvcaglteielt
 atskfvntsaalssltvngtkvsvlaagsyntpaiadvkaegegnasvtpahdnvirvitesedhvtrktftinlgeqef

5 >SEQ ID N°: 7 núcleo catalítico de glucósido hidrolasa de *Bifidobacterium bifidum*

qnrtsdfdanwkmfmsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgv
 ymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgiyrdvltvtdgvhvgngngvaiktpslatq
 nggdvtmnlttkvandteaaanltkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvstitaasplwsiknplytvrtevlnggk
 vldtydteygrwtgfdatsgfsIngekvklkgvsmhhdqsglgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgl
 vveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlpggdkdetwakfdltstinrdrnapsvimwslgnemmegisgsvsgfp
 atsaklvawtkaadstrpmtty

>SEQ ID Nº: 8 secuencia de nucleótidos que codifica la longitud completa

gcagttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgttattcatcagcggcgatagcaa
 acaaaatcgcaagcgatgttgatgcgaactggaatttatgtgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattca
 gcatggcaacaagttgatctgccgatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatctccg
 ggaggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgacgattaatttgatggcgcttat
 atgaatgcaacagctctggttaatggcggttaaactgggcacacatccgatggtattcaccgttttcattgatctgacaggcaatgca
 aaatttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaaagtgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttataga
 gatgttactgacagttacagatggcggtcatgttggcaataatggcgctgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggc
 ggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcggaatgatacagaagcagcagcgaacattactgaaacagacagttttc
 cgaaggcggaacacggatgcagcaattggcaggttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttac
 aagcacaattacagcagcaagccgaaactgtgtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacgga
 ggcaaagttctggatacatatgatacagaatggcttgcgtggacaggcttggatgcaacatcaggctttcactgaatggcgaaa
 aagtcaaactgaaaggcgtagcatcatcatgatcaaggctcacttggcgagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtc
 gaaatcctgcaaaaaatggcgctcaatagcattcgcaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtcgtcaatgaaaa
 aggcgttctggttgcgaagaagctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggttggcca
 agcaattgcaggcgataatgcagttctgggagcgataaagatgaaacatggcgaaattgatcttcatcaacaattaaccgcg
 atagaatgcaccgtcagttattatgtgtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaac
 atcagcaaaactggttgatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactgg
 aacgaatcaatacaatggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttggcacaattattcagatggcgcaaaactatgataa
 aattcgtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaaca
 ggcgagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtat
 tgatgttggatgagagatgttgcgcaggcagcatatgttggacaggatttgattatctggcgaaaccgacaccgtggaatggcaca
 ggctcaggcgagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctatgttggcatcgttgatacagcaggcttccgaaagatacatatt
 atttttatcagagccagtggaatgatgatgttcataactgcataattctccggcatggaatgaaatgttggcaaaaggctcaggc
 aataatgttccggttgcgtttatacagatgcagcgaaagtgaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatc
 ggcaaaaaatcatttacaacaaaaaacaacagcggcaggctatacatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgc
 ataaaaacatgtatctgacatggaatgttcgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgatgatgaaaataatcgctgattc
 cgggaaggcagcacagaaggcaacgcagttacaacaacaggcaaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaac
 aattacagcggatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatag
 agtcacatttgatgttaaaggcgaggcaaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaaggcgataac
 cgaaagcattttcaggcaaaagtcctggcaattgttcagtaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatgg
 cctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcgcagctttattacagcc
 gcaactattatgtcaaaacagggaacaaacccgattctgccgtcagatgttgaagttcgtattcagatggaacaagcgatagacaaa
 acgttacatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcatttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaatta
 gcgttcgcgtcacaatgattgatgaaattggcgactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttctccggg
 atcaagaccggcagtcctgccgatggcacagtcacatcagcaaatgttcagtcattggacaaaaccggcagatacagctataa
 tacagcaggcacagtcgaagtaccgggaacgaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaga
 agccaagttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactg
 gatgcgattaagatggctcaacaacagttgatgcaatacaggcgaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattc

aaaagcaggccataacacagcggaaattacatttgaatatgacagacaacaactggccagatcgatgatttttttcgcga
tagcaatgcagtttagatttccggatgctggcaaaacaaaattcagatcagcgagatggcaaaattggacagatctggcagcaa
cagaacaattgcagcgcaagaatcaagcgatagagtcacacgtatatacatgattttgcaccgggtggcgcaacattgttaaag
tgacagtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcgtgtttgctgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgacaag
caaatttgcacaaatacatcagcagcactgtcatcacttacagtcaatggcacaagtttcagattcagttctggcagcaggctcat
atacacaccggcaattatcgagatgttaaagcgggaaggcgaaggcaatgcaagcgttacagtccttccggcacatgataatgtt
attcgcgtcattacagaaagcgaagatcatgtcacacgcaaaacattacaatcaacctgggcacagaacaagaatttccggctgat
tcagatgaaagagattatccggcagcagatatgacagtcacagttggctcagaacaaacatcaggcacagcaacagaaggaccg
aaaaaatttgcagtcgatggcaacacatcaacatattggcatagcaattggacaccgacaacagttaatgatctgtggatcgctttg
aactgcaaaaaccgacaaaactggatgactgagatatcttccgctccggcaggctcaaaaatggcagcgtcacagaataaa
agttcagggtgcagatgatggaacaaactggacagatgcaggctcaggcacatggacaacggattatggctggaactggcggaa
tttaatcaaccggtcacaacaaacatgttagactgaaagcgggttcatacatatgcagatagcggcaacgataaatttatgagcgca
agcgaattagactgagaaaagcggtcgatacaacggatatttcaggcgcaacagttacagttccggcaaaactgcagttgatag
agttgatgcagatcatccggcaacatttgaacaaaagatgtcacagttacactggagatgcaacactgagatagggcttgatta
tctgctggattatgcaggcaatacagcagttggcaagcaacagtgacagttagaggcattgataaatttcaggcacagtcgcga
aaacattacaattgaactgaaaaatgcaccggcaccggaaccgacactgacatcagtttagcgtcaaaacaaaaccgagcaaaact
gacatatgttgcggagatgatttgcggcaggcctgttctgcaacatgatacagaagcagatagacctccgcaaccgtggtt
ggcgaacaagcggatgaacgcggactgacatgcggcacaagatgcgatagagttgaacaactgcgcaaacatgaaaatagaga
agcgcatagaacaggcctggatcatctggaatttggcgcagcagatggcgagttggagaacaagcaacatttaaagtcctg
tccatgcagatcaggagatggcagacatgatgatgcagatgaacgcgatattgatccgcatgttccggtgatcatgcagttggcg
aactggcaagagcagcatgcatcatgttattggcctgagagtcgatacacatagacttaaagcaagcggcttcaaattccggctg
atgatatggcagaaatcgatcgattacaggcttcatcgttttgaacgcatgtc

>SEQ ID N°: 9 secuencia de nucleótidos que codifica BIF_917

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgttattcatcagcggctgatagcaaca
aaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgcgcatgattatagcatcacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtcgtgttaattggcgttaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaat
ttggcgggagaaaaacaaattgtcgtcaaaagttgaaaaatagactgccgtcatcaagatggatttcaggcagcggcatttatagagatg
ttactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaa
agttctggatacatatgatacagaatattgcttgcgtggacaggctttgatgcaacatcaggctttcactgaatggcgaaaaagtc
aaactgaaaggcgttagcatgatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaat
cctgcaaaaaatggcgtcaatagcattcgacacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcg
ttctggtgtcgaagaagtccttgatattgtgaaccgcagcaaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggcgaagcaa

ttgcaggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcataga
aatgcaccgtcagttattatgtgtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaacatcag
caaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacg
aatcaaatacaatggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttggcacaattattcagatggcgcaactatgataaaattc
gtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcg
gagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctgggagcagttgcatcatcagcatggtatgatg
ttgttcagagagattttgtcgcaggcacatatgttggacaggatttgattatctgggcaaccgacaccgtggaatggcacaggctc
aggcgagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggcttccgaaagatacatattttt
atcagagccagtggaatgatgatgttcatactgcataattctccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataa
tgttccggtgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaagactgatcggcg
aaaatcatttcaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaa
aacatgtatctgacatggaatgttcgtggcgagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgctgattccggaa
ggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaacgagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattac
agcggatggcaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcac
atttgatgttaaaggcgaggcaaaactggtggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaacgggataaccgcaa
agcattttcaggcaaaagtctggaattgttcagtcacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgc
aatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaaca

>SEQ ID Nº: 10 secuencia de nucleótidos que codifica BIF_995

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagtgtttattcatcagcggctgatagcaaaaca
aaatcgcaacagcagttttgatggaactggaatttatgtgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagtgtatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgagtaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagctcgtgttaattggcgttaaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatgtgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaaacacaattgtcgtcaaaagtgaataatgactgccgtcatcaagatggatttcaggcagcggcatttatagagatg
ttactgacagttacagatggcgttcattgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtgcggaatgatacagaagcagcagcaacattactgaaacagacagttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaactgttgtaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaa
agttctggatacatatgatacagaatatggcttctgctggacaggctttgatgcaacatcaggctttcactgaatggcgaaaaagtc
aaactgaaaggcgttagcatgcatgatcaaggctcacttggcgagttgcaaatagacgcgcaattgaagacaagtcgaaat
cctgcaaaaaatggcgtcaatagcattcgcaacaacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcg
ttctggtgtcgaagaagtctttgatatgtgaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggttggccaagcaa
ttgcaggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcaaatgtgatcttacatcaacaattaaccgcataga
aatgcaccgtcagttattatgtgtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaacatcag
caaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacg
aatcaaatacaatggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttggcacaattattcagatggcgcaactatgataaaattc
gtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcg

gagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatg
 ttgttcagagagatthttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctggggaaccgacaccgtggaatggcacaggctc
 aggcgcagttggctcatggccgtaccgaaaaatagctatthttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattthtt
 atcagagccagtggaatgatgatgttcatacactgcatacttccggcatggaatgaaaatgttgtgcaaaaggctcaggcaataa
 tgttccggttgctgtttatacagatgcagcgaaagtgaactgtatthttacccgaaaggctcaacagaaaaagactgatcggcga
 aaaatcatttacaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaa
 aacatgtatctgacatggaatgtccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgatgatgaaaataatcgctgattccggaa
 ggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattac
 agcggatggcaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcac
 atttgatgttaaaggcgcaggcaaaactggttggtgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaa
 agcattthtcaggcaaaagtcctggcaatgttcagtcacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgc
 aatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcgcagctttattacagccgcaac
 tattatgtcaaaacaggcaacaacacgattctgccgtcagatgttgaaagtcgctattcagatggaacaagcagatagaaaaacgtt
 acatgggatgcagttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattthtcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttc
 ggcgcacaatgattgatgaaattggcgactg

>SEQ ID Nº: 11 secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1068

gttgaagatgcaacaagaagcagatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggctgtagcaaaaca
 aaatcgcaacagcagattthttgatggaactggaatttatgtctgcagatagcgttcaagcacaagatccggcattthttgatgattcagca
 tggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
 ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattthttgatggcgtctatatga
 atgcaacagctcgttttaattggcgttaactgggcacacatccgcatggtattcaccgthttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
 ttggcggagaaaaacacaattgtcgtcaaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
 ttactgacagttacagatggcgttcatgttggaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
 atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagttthttccgaaa
 ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
 caattacagcagcaagcccgaactgttggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaa
 agttctggatacatatgatacagaatatggcttgcgtggacagcgtttgatgcaacatcaggcttttactgaatggcgaaaaagtc
 aaactgaaaggcgttagcatgcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaat
 cctgcaaaaaatggcgctcaatagcattcgcaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcg
 ttctggtgtcgaagaagctthttgatatgtggaaccgcagcaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaa
 ttgcaggcgataatgcagttctggaggcgataaagatgaacatggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgataga
 aatgcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaacatcag
 caaaactggttgcatgagcaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgatacaaaaattaaagcgaactggaacg
 aatcaaatacaatggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttgccacaaattattcagatggcgcaaatatgataaaattc
 gtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcg
 gagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatg
 ttgttcagagagatthttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctggggaaccgacaccgtggaatggcacaggctc

aggcgagttggctcatggccgtaccgaaaaatagctatgttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattttt
atcagagccagtggaatgatgatgttcatactgcatattctccggcatggaatgaaatgtgttgcaaaaggctcaggcaataa
tgttccggtgtcggtttatcacagatgcagcgaaagtgaactgtatttacacgaaaggctcaacagaaaaagactgatcggcga
aaaatcatttacaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaa
aacatgtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgctgattccggaa
ggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattac
agcggatggcaaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagatcac
atgtgatgttaaaggcgagcgaactggtggcgttgataatggctcatccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaa
agcattttcaggcaaaagtctggaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgc
aatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcaggcagctttattacagccgcaac
tattatgtcaaaacaggcaacaaacgattctgccgtcagatgtgaagttcgctattcagatggaacaagcagatagacaaaacggt
acatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttc
ggtcacatgattgatgaaattggcgactgtgaattattcagcaagcacaccggttgcaaccggcagttctccgggatcaa
gaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaatgttcagtcattggacaaaaccggcagatacagtcataatacag
caggcacagtcgaagtaccgggaacagcaacagttttggcaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaa

>SEQ ID Nº: 12 secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1172

gttgaagatgcaacaagaagcagatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagtgtttattcatcagcggctgatagcaaaaca
aatcgcacaagcgttttgatgcgaactggaatttatgtctgcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagtgtatctgccgcatgattatagcatcacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagcttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaatttgatggcgtctatatga
atgcaacagtcgtgttaattggcgttaactgggcacacatccgtatggctattcacggttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaaacacaattgtcgtcaaaagtgaataatagactgccgtcatcaagatggattcaggcagcggcatttatagagatg
ttactgacagttacagatggcgttcattgttggaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcggaatgatacagaagcagcagcgaacattactgaaacagacagttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcagattacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaactgttggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagtctgaacggaggcaa
agttctggatacatatgatacagaatatggcttgcgtggacagcgtttgatgcaacatcaggcgtttcactgaatggcgaaaaagtc
aaactgaaaggcgttagcatgcatgatcaaggctcactggcgagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaat
cctgcaaaaaatggcgctcaatagcattcgcaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcg
ttctggtgtcgaagaagtctttgatatgtgaaccgcagcaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggttgccaaagcaa
ttgcaggcgataatgcagttctgggagcgataaagatgaacatggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgataga
aatgcaccgtcagttattatgtgtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaacatcag
caaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacg
aatcaaatacaatggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttgccacaaattattcagatggcgcaaatatgataaaattc
gtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcg
gagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggtggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatg
ttgttcagagagattttgtcgaggcacatatgtttggacaggatttgattatctggcgcaaccgacaccgtggaatggcacaggctc

aggcgagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctatgttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattttt
atcagagccagtggaatgatgatgttcatactgcatacttctccggcatggaatgaaatgtgttgcaaaaggctcaggcaataa
tgttccggttgctgtttatagatgcagcgaaagtgaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaagactgatcggcga
aaaatcatttcaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaa
aacatgtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgctgattccggaa
ggcagcacagaaggcaacgcagtcagttacaacaacaggcaaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattac
agcggatggcaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagatcac
atgtgatgttaaaggcgaggcaaaactggtggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaa
agcattttcaggcaaaagtctgtgaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgc
aatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcaggcagctttattacagccgcaac
tattatgtcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgtattcagatggaacaagcagatagacaaaacggtt
acatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttc
gctgcacaatgattgatgaaattggcgactgtgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccgggatcaa
gaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaatgttcagtcattggacaaaaccggcagatacagtcataatacag
caggcacagtcgaagtaccgggaacagcaacagttttggcaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaagaagcca
agttacaattggctcatcagtttcaggaaatgactgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgc
gattaaagatggctcaacaacagttgatgcaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaa
gcaggccataacacagcggaaattacattgaaatgacagacagaacaactgggccagatcgtcatgtattttttcgcatagca
atgcagtttagatttccggatgctggcaaaacaaaaattcagatc

>SEQ ID N°: 13 secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1241

gttgaagatgcaacaagaagcagatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagtgtttattcatcagcggctcagatgcaaca
aaatcgcaacagcagttttgatgcgaactggaatttatgtctgcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggaacaagtgtatctgccgatgattatagcatcacacagaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcgaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtcgtgttaattggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccggtttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaaacacaattgtcgtcaaaagtgaataatagactgccgtcatcaagatgggtattcaggcagcggcatttatagatg
ttactgacagttacagatggcgttcattgttggaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcaacattacactgaaacagacagttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaactgtgttcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagtctgaacggaggcaa
agttctggatacatatgatacagaatatggcttctgctggcagagcgttgatgcaacatcaggctttcactgaatggcgaaaaagtc
aaactgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaat
cctgcaaaaaatggcgtaatagcattcgcaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcg
ttctggttgcaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggttggccaagcaa
ttgcaggcgataatgcagttctggaggcgataaagatgaacatgggcgaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgataga
aatgcaccgtcagttattatgtgtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaacatcag
caaaactggttgatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacg

aatcaaatacaatggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttggcacaattattcagatggcgcaaactatgataaaattc
gtacaacacatccgcatgggcaatttatggctcagaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcg
gagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatg
ttgttcagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctggggaaccgacaccgtggaatggcacaggctc
aggcgagttggctcatggcgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattttt
atcagagccagtggaatgatgatgttcatactgcatattctccggcatggaatgaaaatgttgtgcaaaaggctcaggcaataa
tgttccggtgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaagactgatcggcga
aaaatcatttcaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaa
aacatgtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgtatgatgaaaataatcgctgattccggaa
ggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaagcagcaaaactgaagcagatgcggatcgcaaaacaattac
agcggatggcaagatctgtcatatattgaagtcgatgcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcac
atttgatgttaaaggcgaggcaaaactgggtggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaa
agcattttcaggcaaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgc
aatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtcggcagctttttacagccgcaac
tattatgtcaaaacaggcaacaacccgattctgccgtcagatgttgaagttcgtattcagatggaacaagcgatagacaaaacggtt
acatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttc
gcgtcacaatgattgatgaaattggcgactgtgaattattcagcaagcacaccgggtggcacaccggcagttcttccgggatcaa
gaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaatttgcagtcattggacaaaaccggcagatacagtcataatacag
caggcacagtc aaagtaccgggaacagcaacagttttggcaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaagaagcca
agttacaattggctcatcagtttcaggaaatgactgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgc
gattaaagatggctcaacaacagttgatgcaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaa
gcaggccataacacagcggaaattacattgaaatgacgacagaacaacaactgggccagatcgtcatgtattttttcgcgatagca
atgcagtttagatttccggatgctggcaaaaacaaaattcagatcagcgagatggcaaaaattggacagatctggcagcaacaga
aacaattgcagcgcaagaatcaagcgatagagtc aaaccgtatacatatgattttgaccgggtggcgcaacattgttaaagtgc
agtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcgtgtttgcgaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgaca

>SEQ ID N°: 14 secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1326

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggctgatagcaaaca
aaatcgcaacagcgattttgatgcgaactggaaatttatgtctgcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgccgatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagctcgttttaattggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatgggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttactgacagttacagatggcgttcattgttgcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattactgaaacagacagttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaactgtgttcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaa
agttctggatacatatgatacagaatatggccttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttactgaatggcgaaaaagtc

aaactgaaaggcgtagcatgcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagcgcgcaattgaaagacaagtcgaaat
cctgcaaaaaatggcgctcaatagcattcgacacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcg
ttctgggttcgaagaagcttctgatattggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaa
ttgcaggcgataatgcagttctgggagcgataaagatgaacatggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgataga
aatgcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggcttccggcaacatcag
caaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataaaaaattaaagcgaactggaacg
aatcaaatacaatggcgataatctgacagcaaatggcgagttgttggcacaattattcagatggcgcaactatgataaaattc
gtacaacacatccgctatgggcaattatggctcagaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataagaacaacaggcg
gagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatg
ttgttcagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctggcgaaaccgacaccgtggaatggcacaggctc
aggcgagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggcttccgaaagatacatattttt
atcagagccagtggaaatgatgatgttcataactgcataattctccggcatggaatgaaaatgttggcgaaggctcaggcaataa
tgttccggttgctgtttatagatgcagcgaaagtgaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcga
aaaatcatttacaaaaaaacaacagcgaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaa
aacatgtatctgacatggaatgttcggtggcagaaggcacaatttcagcggaagcgatgatgaaaataatcgctgattccggaa
ggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaaagcagcaaaactgaagcagatgcggatcgcaaaacaattac
agcggatggcaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttcggatgcagcaaatagagtcac
atttgatgttaaaggcgaggcaaaactggtggcggttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaa
agcattttcaggcaaaagtcctggcaattgttcagtcacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgc
aatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagccgcagctttattacagccgcaac
tattatgtcaaaacagggaacaaacaggttctgcgctcagatgttgaagttcgtattcagatggaacaagcgatagacaaaacggt
acatgggatgcagtttcagatgatcaaatgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcggtc
gcgtcacaatgattgatgaaattggcgactgtgaattattcagcaagcacaccggttgacacaccggcagttctccgggatcaa
gaccggcagtcctgccgatggcacagtcacatcagcaaattttgagtcattggacaaaaccggcagatacagctataatacag
caggcacagtcacaagtaccgggaacagcaacagttttggcaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagcca
agttacaattggctcatcagtttcaggaaatgactgagactgacacaaaattccggcagataaacaatcagatacactggatgc
gattaaagatggctcaacaacagttgatgcaatacaggcgaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcataattcaaaa
gcaggccataacacagcggaattacattgaaatgcgacagaacaacaactgggccagatcgatgtattttttcggatagca
atgcagtttagatttccggatgctggcaaaacaaaattcagatcagcgagatggcaaaattggacagatctggcagcaacaga
aacaattgcagcgcaagaatcaagcgatagagtcacacagctatacatgattttgcaccggttgcgcaacattgttaaagtgac
agtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcggtgttgcgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgacaagcaaa
ttgtcacaaatacatcagcagcactgtcatcactacagtcattggcacaagtttcagattcagttctggcagcaggctcatataa
cacaccggcaattatcgagatgttaaagcggaaggcggaaggaatgcaagcgttacagtcctccggcacatgataatgttattcg
cgtcattacagaaagcgaagatcatgtcacacgcaaaacatttacaatcaacctgggcacagaacaagaattt

>SEQ ID N°: 15 cebador directo para la generación de las variantes de BIF

GGGGTAACTAGTGGAAGATGCAACAAGAAG

>SEQ ID N°: 16 cebador inverso para BIF917

5 GCGCTTAATTAATTATGTTTTTCTGTGCTTGTTT

>SEQ ID N°: 17 cebador inverso para BIF995

GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTCATCAATCA

>SEQ ID N°: 18 cebador inverso para BIF1068

GCGCTTAATTAATTATTGAACTCTAATTGTCGCTG

10 **>SEQ ID N°: 19 cebador inverso para BIF1241**

GCGCTTAATTAATTATGTCGCTGTTTTAGTTCAAT

>SEQ ID N°: 20 cebador inverso para BIF1326

GCGCTTAATTAATTAATAATTCTTGTCTGTGCCCA

>SEQ ID N°: 21 cebador inverso para BIF1478

5 GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTTGCTTGCGC

>SEQ ID N°: 22 *Bifidobacterium bifidum* BIF1750

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtstfdanwfkmlsdsqadpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrvtltvtgdgvhvgngvaiktpslatqnggdvtmnltkvandteaaanilkqtvfpggktdaigtvttaskiaagasadv
stitaasplksiknplytvrtevlnggkvldtydeygrfwtgfdatsgfsIngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvnekgvlvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlbgdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtgydnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnasvsgwgavassawdyvvrqdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswwpsknsyfgivdtagfpkdyfyqsqwvnddvhtlhlpawnenvvaksgnnpvvyvtaakvklyft
pkgsteklrigesftkktaagytyqvyegsdkdstahknmyltnvpwaeqtisaeaydennrlipegstegnasvtttgaak
lkadadrktitadgkdslyievdtdanghivpdaanrvtdvkgagklvgvndgsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeag
eitvtakadglqssvtkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvtgknkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtdavsdqiaagsfsva
gtvagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfahwtkpadtyntagtkvpgtatvfgkefvt
atirvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtdaikdgsttdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqiv
myffrdsnavrfpdagtkkiqisadgknwtdlaetiaaqaessdrvkpytydfapvgatfvkvtvtnadtttsgvvcaglteielkt
atskfvntsaalssltvngtkvsdsvlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtpahdnvirvitesedhvrktftinlgtetqefpads
derdypaadmtvtvgseqtsgtategpkkfavdgntstywhsnwpttvdnlwiafelqkptklalrylprpagskngsvteykv
qvsddgtnwtdagsgtwttidygwklafnqpvttkhvrkavhtyadsgndkfmsaseirrkavdttdisgatvtpakltvdrvd
adhpatfatkdvtvtlgtatlyrgvdyldiyagntavgkatvtvrgidkysgtvaktftielknapapeptltsvsvtkpskltyvvgd
afdpaglvqlhqrqdrppqplvgeqadergltcgttrcdveqlrkhenreahrtgldhlefvgaadgavgeqatfkvhvhadqgd
grhddaderdidphvpvdhavgelaraachhvigrvdthrlkasgfpqipaddmaeidritgfhferhv

>SEQ ID N°: 23 la secuencia señal de lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215

10 Vrsklwlslflalaliftmafgstssaqa

Listado de secuencias

<110> DuPont Nutrition BioSciences ApS

<120> Polipéptidos que tienen actividad transgalactosilante

<130> NB40269WOPCT

15 <160> 23

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 887

<212> PRT

20 <213> *Bifidobacterium bifidum*

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..887

<223> /tipo de molécula ="proteína" /organismo ="*Bifidobacterium bifidum*"

25 <400> 1

ES 2 650 444 T3

Val	Glu	Asp	Ala	Thr	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Thr	Gln	Met	Ser	Ser	Thr
1				5					10					15	
Pro	Glu	Val	Val	Tyr	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Ser	Lys	Gln	Asn	Arg	Thr
		20						25					30		
Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Asn	Trp	Lys	Phe	Met	Leu	Ser	Asp	Ser	Val	Gln
	35					40					45				
Ala	Gln	Asp	Pro	Ala	Phe	Asp	Asp	Ser	Ala	Trp	Gln	Gln	Val	Asp	Leu
50					55					60					
Pro	His	Asp	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gln	Lys	Tyr	Ser	Gln	Ser	Asn	Glu	Ala
65					70				75					80	
Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Pro	Gly	Gly	Thr	Gly	Trp	Tyr	Arg	Lys	Ser	Phe
			85					90					95		
Thr	Ile	Asp	Arg	Asp	Leu	Ala	Gly	Lys	Arg	Ile	Ala	Ile	Asn	Phe	Asp
		100						105					110		
Gly	Val	Tyr	Met	Asn	Ala	Thr	Val	Trp	Phe	Asn	Gly	Val	Lys	Leu	Gly
	115					120						125			
Thr	His	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Pro	Phe	Ser	Phe	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn
	130					135					140				
Ala	Lys	Phe	Gly	Gly	Glu	Asn	Thr	Ile	Val	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Arg
145					150					155				160	
Leu	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Tyr	Arg	Asp	Val
			165					170					175		
Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Val	His	Val	Gly	Asn	Asn	Gly	Val	Ala
		180						185					190		
Ile	Lys	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Thr	Gln	Asn	Gly	Gly	Asp	Val	Thr	Met
	195						200					205			
Asn	Leu	Thr	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Asp	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile
	210					215					220				
Thr	Leu	Lys	Gln	Thr	Val	Phe	Pro	Lys	Gly	Gly	Lys	Thr	Asp	Ala	Ala
225					230					235				240	
Ile	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser
			245						250				255		
Ala	Asp	Val	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	Ser
		260						265					270		
Ile	Lys	Asn	Pro	Asn	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg	Thr	Glu	Val	Leu	Asn	Gly
	275						280					285			
Gly	Lys	Val	Leu	Asp	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Gly	Phe	Arg	Trp	Thr
	290					295					300				
Gly	Phe	Asp	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Asn	Gly	Glu	Lys	Val	Lys

305					310					315				320	
Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Met	His	His	Asp	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Ala	Val
				325					330					335	
Ala	Asn	Arg	Arg	Ala	Ile	Glu	Arg	Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Met
			340					345					350		
Gly	Val	Asn	Ser	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu
		355						360				365			
Ile	Asp	Val	Cys	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Val	Phe
	370					375					380				
Asp	Met	Trp	Asn	Arg	Ser	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Glu	Asp	Tyr	Gly	Lys
385					390					395					400
Trp	Phe	Gly	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Asp
			405					410						415	
Lys	Asp	Glu	Thr	Trp	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Asn	Arg
			420					425					430		
Asp	Arg	Asn	Ala	Pro	Ser	Val	Ile	Met	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Glu	Met
		435						440				445			
Met	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala
	450					455					460				
Lys	Leu	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Met	Thr
465					470					475					480
Tyr	Gly	Asp	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asn	Trp	Asn	Glu	Ser	Asn	Thr	Met
			485					490						495	
Gly	Asp	Asn	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ser
		500						505					510		
Asp	Gly	Ala	Asn	Tyr	Asp	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Pro	Ser	Trp	Ala
	515						520					525			
Ile	Tyr	Gly	Ser	Glu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Arg	Gly	Ile	Tyr
	530					535					540				
Asn	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Leu	Thr	Ser
545					550					555					560
Tyr	Asp	Asn	Ser	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ala	Trp
			565					570						575	
Tyr	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr
		580						585					590		
Gly	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Pro	Trp	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser
	595						600					605			
Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Pro	Ser	Pro	Lys	Asn	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile
	610					615					620				
Val	Asp	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Ser
625					630					635					640
Gln	Trp	Asn	Asp	Asp	Val	His	Thr	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Ala	Trp	Asn
			645					650						655	
Glu	Asn	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Asn	Val	Pro	Val	Val	Val
		660						665					670		
Tyr	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Gly	Ser
	675						680					685			
Thr	Glu	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Lys	Lys	Thr	Thr
	690					695					700				
Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Asp	Ser
705					710					715					720
Thr	Ala	His	Lys	Asn	Met	Tyr	Leu	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Trp	Ala	Glu
			725					730						735	
Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ile	Pro
		740						745					750		
Glu	Gly	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Ala
	755						760						765		
Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gly
	770					775						780			
Lys	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ile	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly	His
785					790					795					800
Ile	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Thr	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Ala
				805					810					815	

Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
820 825 830
Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
835 840 845
Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
850 855 860
Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
865 870 875 880
Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr
885

<210> 2

<211> 965

<212> PRT

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..965

<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 2

Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
1 5 10 15
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
20 25 30
Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
35 40 45
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
50 55 60
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
65 70 75 80
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
85 90 95
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
100 105 110
Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
115 120 125
Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
130 135 140
Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
145 150 155 160
Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
165 170 175
Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
180 185 190
Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
195 200 205
Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Ala Asn Ile
210 215 220
Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
225 230 235 240
Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
245 250 255
Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
260 265 270
Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
275 280 285
Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
290 295 300
Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
305 310 315 320

Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Met	His	His	Asp	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	325	330	335
Ala	Asn	Arg	Arg	Ala	Ile	Glu	Arg	Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Met	340	345	350
Gly	Val	Asn	Ser	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	355	360	365
Ile	Asp	Val	Cys	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Val	Phe	370	375	380
Asp	Met	Trp	Asn	Arg	Ser	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Glu	Asp	Tyr	Gly	Lys	385	390	395
Trp	Phe	Gly	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	405	410	415
Lys	Asp	Glu	Thr	Trp	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Asn	Arg	420	425	430
Asp	Arg	Asn	Ala	Pro	Ser	Val	Ile	Met	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Glu	Met	435	440	445
Met	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	450	455	460
Lys	Leu	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Met	Thr	465	470	475
Tyr	Gly	Asp	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asn	Trp	Asn	Glu	Ser	Asn	Thr	Met	485	490	495
Gly	Asp	Asn	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ser	500	505	510
Asp	Gly	Ala	Asn	Tyr	Asp	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Pro	Ser	Trp	Ala	515	520	525
Ile	Tyr	Gly	Ser	Glu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Arg	Gly	Ile	Tyr	530	535	540
Asn	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Leu	Thr	Ser	545	550	555
Tyr	Asp	Asn	Ser	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ala	Trp	565	570	575
Tyr	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr	580	585	590
Gly	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Pro	Trp	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser	595	600	605
Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Pro	Ser	Pro	Lys	Asn	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile	610	615	620
Val	Asp	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Ser	625	630	635
Gln	Trp	Asn	Asp	Asp	Val	His	Thr	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Ala	Trp	Asn	645	650	655
Glu	Asn	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Asn	Val	Pro	Val	Val	Val	660	665	670
Tyr	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Gly	Ser	675	680	685
Thr	Glu	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Lys	Lys	Thr	Thr	690	695	700
Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Asp	Ser	705	710	715
Thr	Ala	His	Lys	Asn	Met	Tyr	Leu	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Trp	Ala	Glu	725	730	735
Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ile	Pro	740	745	750
Glu	Gly	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Ala	755	760	765
Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gly	770	775	780
Lys	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ile	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly	His	785	790	795
Ile	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Thr	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Ala	805	810	815
Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Ser	Pro	Asp	His	Asp	Ser			

			820					825					830				
Tyr	Gln	Ala	Asp	Asn	Arg	Lys	Ala	Phe	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Ala	Ile		
		835					840					845					
Val	Gln	Ser	Thr	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Lys	Ala		
	850					855					860						
Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Thr	Val	Lys	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	Val	Pro		
865					870					875					880		
Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Lys	Thr	Val	Arg	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Arg	Asn		
				885					890					895			
Tyr	Tyr	Val	Lys	Thr	Gly	Asn	Lys	Pro	Ile	Leu	Pro	Ser	Asp	Val	Glu		
		900						905					910				
Val	Arg	Tyr	Ser	Asp	Gly	Thr	Ser	Asp	Arg	Gln	Asn	Val	Thr	Trp	Asp		
	915							920					925				
Ala	Val	Ser	Asp	Asp	Gln	Ile	Ala	Lys	Ala	Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Ala		
	930					935					940						
Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Gln	Lys	Ile	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Met	Ile	Asp		
945					950					955					960		
Glu	Ile	Gly	Ala	Leu													
				965													

<210> 3
 <211> 1038
 <212> PRT
 5 <213> Bifidobacterium bifidum
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..1038
 <223> /tipo de molécula="proteína"/organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 3

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

245								250						255			
Ala	Asp	Val	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	Ser		
			260						265				270				
Ile	Lys	Asn	Pro	Asn	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg	Thr	Glu	Val	Leu	Asn	Gly		
		275					280					285					
Gly	Lys	Val	Leu	Asp	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Gly	Phe	Arg	Trp	Thr		
		290				295					300						
Gly	Phe	Asp	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Asn	Gly	Glu	Lys	Val	Lys		
305					310					315					320		
Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Met	His	His	Asp	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Ala	Val		
				325				330						335			
Ala	Asn	Arg	Arg	Ala	Ile	Glu	Arg	Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Met		
			340					345					350				
Gly	Val	Asn	Ser	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu		
		355					360					365					
Ile	Asp	Val	Cys	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Val	Phe		
		370				375					380						
Asp	Met	Trp	Asn	Arg	Ser	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Glu	Asp	Tyr	Gly	Lys		
385					390					395					400		
Trp	Phe	Gly	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Asp		
			405					410						415			
Lys	Asp	Glu	Thr	Trp	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Asn	Arg		
			420					425					430				
Asp	Arg	Asn	Ala	Pro	Ser	Val	Ile	Met	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Glu	Met		
			435				440					445					
Met	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala		
		450				455					460						
Lys	Leu	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Met	Thr		
465					470					475					480		
Tyr	Gly	Asp	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asn	Trp	Asn	Glu	Ser	Asn	Thr	Met		
			485						490					495			
Gly	Asp	Asn	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ser		
			500					505					510				
Asp	Gly	Ala	Asn	Tyr	Asp	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Pro	Ser	Trp	Ala		
		515					520					525					
Ile	Tyr	Gly	Ser	Glu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Arg	Gly	Ile	Tyr		
		530				535					540						
Asn	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Leu	Thr	Ser		
545					550					555					560		
Tyr	Asp	Asn	Ser	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ala	Trp		
			565						570					575			
Tyr	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr		
			580					585					590				

Glu Gly Ser Thr Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Thr Thr Gly Lys Ala
755 760 765
Ala Lys Leu Lys Ala Asp Ala Asp Arg Lys Thr Ile Thr Ala Asp Gly
770 775 780
Lys Asp Leu Ser Tyr Ile Glu Val Asp Val Thr Asp Ala Asn Gly His
785 790 795 800
Ile Val Pro Asp Ala Ala Asn Arg Val Thr Phe Asp Val Lys Gly Ala
805 810 815
Gly Lys Leu Val Gly Val Asp Asn Gly Ser Ser Pro Asp His Asp Ser
820 825 830
Tyr Gln Ala Asp Asn Arg Lys Ala Phe Ser Gly Lys Val Leu Ala Ile
835 840 845
Val Gln Ser Thr Lys Glu Ala Gly Glu Ile Thr Val Thr Ala Lys Ala
850 855 860
Asp Gly Leu Gln Ser Ser Thr Val Lys Ile Ala Thr Thr Ala Val Pro
865 870 875 880
Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
885 890 895
Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
900 905 910
Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp
915 920 925
Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
930 935 940
Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
945 950 955 960
Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr
965 970 975
Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr
980 985 990
Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr
995 1000 1005
Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val
1010 1015 1020
Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln
1025 1030 1035

<210> 4

<211> 1142

<212> PRT

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..1142

<223> /tipo de molécula ="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 4

Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
1 5 10 15
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
20 25 30
Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
35 40 45
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
50 55 60
Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
65 70 75 80
Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
85 90 95
Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
100 105 110

Gly	Val	Tyr	Met	Asn	Ala	Thr	Val	Trp	Phe	Asn	Gly	Val	Lys	Leu	Gly	
	115						120					125				
Thr	His	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Pro	Phe	Ser	Phe	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	
	130						135				140					
Ala	Lys	Phe	Gly	Gly	Glu	Asn	Thr	Ile	Val	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Arg	
145					150					155					160	
Leu	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Tyr	Arg	Asp	Val	
				165					170					175		
Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Val	His	Val	Gly	Asn	Asn	Gly	Val	Ala	
			180						185					190		
Ile	Lys	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Thr	Gln	Asn	Gly	Gly	Asp	Val	Thr	Met	
	195						200					205				
Asn	Leu	Thr	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Asp	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	
	210						215				220					
Thr	Leu	Lys	Gln	Thr	Val	Phe	Pro	Lys	Gly	Gly	Lys	Thr	Asp	Ala	Ala	
225					230					235					240	
Ile	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	
			245						250					255		
Ala	Asp	Val	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	Ser	
			260					265						270		
Ile	Lys	Asn	Pro	Asn	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg	Thr	Glu	Val	Leu	Asn	Gly	
	275						280					285				
Gly	Lys	Val	Leu	Asp	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Gly	Phe	Arg	Trp	Thr	
	290					295					300					
Gly	Phe	Asp	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Asn	Gly	Glu	Lys	Val	Lys	
305					310					315					320	
Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Met	His	His	Asp	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	
				325					330					335		
Ala	Asn	Arg	Arg	Ala	Ile	Glu	Arg	Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Met	
			340					345					350			
Gly	Val	Asn	Ser	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	
	355						360					365				
Ile	Asp	Val	Cys	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Val	Phe	
	370				375						380					
Asp	Met	Trp	Asn	Arg	Ser	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Glu	Asp	Tyr	Gly	Lys	
385					390					395					400	
Trp	Phe	Gly	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	
			405					410						415		
Lys	Asp	Glu	Thr	Trp	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Asn	Arg	
			420					425					430			
Asp	Arg	Asn	Ala	Pro	Ser	Val	Ile	Met	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Glu	Met	
	435						440					445				
Met	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	
	450					455				460						
Lys	Leu	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Met	Thr	
465					470					475					480	
Tyr	Gly	Asp	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asn	Trp	Asn	Glu	Ser	Asn	Thr	Met	
			485						490					495		
Gly	Asp	Asn	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ser	
			500					505					510			
Asp	Gly	Ala	Asn	Tyr	Asp	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Pro	Ser	Trp	Ala	
	515						520					525				
Ile	Tyr	Gly	Ser	Glu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Arg	Gly	Ile	Tyr	
	530					535					540					
Asn	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Leu	Thr	Ser	
545					550					555					560	
Tyr	Asp	Asn	Ser	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ala	Trp	
			565						570					575		
Tyr	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr	
			580					585					590			
Gly	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Pro	Trp	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser	
	595						600					605				
Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Pro	Ser	Pro	Lys	Asn	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile	

610						615						620					
Val 625	Asp	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Ser	640	
Gln	Trp	Asn	Asp	Asp	Val	His	Thr	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Ala	Trp	Asn		
				645					650					655			
Glu	Asn	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Asn	Val	Pro	Val	Val	Val		
				660					665					670			
Tyr	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Gly	Ser		
				675					680					685			
Thr	Glu	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Lys	Lys	Thr	Thr		
						695					700						
Ala 705	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Asp	Ser		
						710					715				720		
Thr	Ala	His	Lys	Asn	Met	Tyr	Leu	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Trp	Ala	Glu		
				725						730				735			
Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ile	Pro		
				740					745					750			
Glu	Gly	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Ala		
				755					760					765			
Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gly		
						775					780						
Lys 785	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ile	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly	His		
						790				795					800		
Ile	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Thr	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Ala		
				805						810				815			
Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Ser	Pro	Asp	His	Asp	Ser		
				820					825					830			
Tyr	Gln	Ala	Asp	Asn	Arg	Lys	Ala	Phe	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Ala	Ile		
				835					840					845			
Val	Gln	Ser	Thr	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Lys	Ala		
						855					860						
Asp 865	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Thr	Val	Lys	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	Val	Pro		
						870				875					880		
Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Lys	Thr	Val	Arg	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Arg	Asn		
				885						890				895			
Tyr	Tyr	Val	Lys	Thr	Gly	Asn	Lys	Pro	Ile	Leu	Pro	Ser	Asp	Val	Glu		
				900					905					910			
Val	Arg	Tyr	Ser	Asp	Gly	Thr	Ser	Asp	Arg	Gln	Asn	Val	Thr	Trp	Asp		
						920					925						
Ala	Val	Ser	Asp	Asp	Gln	Ile	Ala	Lys	Ala	Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Ala		
						935					940						
Gly 945	Thr	Val	Ala	Gly	Gln	Lys	Ile	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Met	Ile	Asp		
						950				955					960		
Glu	Ile	Gly	Ala	Leu	Leu	Asn	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr						

Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly
 1125 1130 1135
 Lys Thr Lys Ile Gln Ile
 1140

<210> 5
 <211> 1211
 <212> PRT
 5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..1211
 <223> /tipo de molécula ="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 5

Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
 20 25 30
 Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
 35 40 45
 Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu
 50 55 60
 Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr Arg Lys Ser Phe
 85 90 95
 Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala Ile Asn Phe Asp
 100 105 110
 Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly Val Lys Leu Gly
 115 120 125
 Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp Leu Thr Gly Asn
 130 135 140
 Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys Val Glu Asn Arg
 145 150 155 160
 Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile Tyr Arg Asp Val
 165 170 175
 Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn Asn Gly Val Ala
 180 185 190
 Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly Asp Val Thr Met
 195 200 205
 Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala Ala Asn Ile
 210 215 220
 Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys Thr Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala Ala Gly Ala Ser
 245 250 255
 Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ser
 260 265 270
 Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu Val Leu Asn Gly
 275 280 285
 Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly Phe Arg Trp Thr
 290 295 300
 Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly Glu Lys Val Lys
 305 310 315 320
 Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser Leu Gly Ala Val
 325 330 335
 Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile Leu Gln Lys Met
 340 345 350
 Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala Ala Lys Ala Leu
 355 360 365

ES 2 650 444 T3

Ile	Asp	Val	Cys	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Val	Phe	370	375	380
Asp	Met	Trp	Asn	Arg	Ser	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Glu	Asp	Tyr	Gly	Lys	385	390	395
Trp	Phe	Gly	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	405	410	415
Lys	Asp	Glu	Thr	Trp	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Asn	Arg	420	425	430
Asp	Arg	Asn	Ala	Pro	Ser	Val	Ile	Met	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Glu	Met	435	440	445
Met	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	450	455	460
Lys	Leu	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Met	Thr	465	470	475
Tyr	Gly	Asp	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asn	Trp	Asn	Glu	Ser	Asn	Thr	Met	485	490	495
Gly	Asp	Asn	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ser	500	505	510
Asp	Gly	Ala	Asn	Tyr	Asp	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Pro	Ser	Trp	Ala	515	520	525
Ile	Tyr	Gly	Ser	Glu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Arg	Gly	Ile	Tyr	530	535	540
Asn	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Leu	Thr	Ser	545	550	555
Tyr	Asp	Asn	Ser	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ala	Trp	565	570	575
Tyr	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr	580	585	590
Gly	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Pro	Trp	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser	595	600	605
Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Pro	Ser	Pro	Lys	Asn	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile	610	615	620
Val	Asp	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Ser	625	630	635
Gln	Trp	Asn	Asp	Asp	Val	His	Thr	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Ala	Trp	Asn	645	650	655
Glu	Asn	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Asn	Val	Pro	Val	Val	Val	660	665	670
Tyr	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Gly	Ser	675	680	685
Thr	Glu	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Lys	Lys	Thr	Thr	690	695	700
Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Asp	Ser	705	710	715
Thr	Ala	His	Lys	Asn	Met	Tyr	Leu	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Trp	Ala	Glu	725	730	735
Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ile	Pro	740	745	750
Glu	Gly	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Ala	755	760	765
Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gly	770	775	780
Lys	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ile	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly	His	785	790	795
Ile	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Thr	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Ala	805	810	815
Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Ser	Pro	Asp	His	Asp	Ser	820	825	830
Tyr	Gln	Ala	Asp	Asn	Arg	Lys	Ala	Phe	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Ala	Ile	835	840	845
Val	Gln	Ser	Thr	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Lys	Ala	850	855	860
Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Thr	Val	Lys	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	Val	Pro			

```

865          870          875          880
Gly Thr Ser Thr Glu Lys Thr Val Arg Ser Phe Tyr Tyr Ser Arg Asn
      885          890          895
Tyr Tyr Val Lys Thr Gly Asn Lys Pro Ile Leu Pro Ser Asp Val Glu
      900          905          910
Val Arg Tyr Ser Asp Gly Thr Ser Asp Arg Gln Asn Val Thr Trp Asp
      915          920          925
Ala Val Ser Asp Asp Gln Ile Ala Lys Ala Gly Ser Phe Ser Val Ala
      930          935          940
Gly Thr Val Ala Gly Gln Lys Ile Ser Val Arg Val Thr Met Ile Asp
      945          950          955          960
Glu Ile Gly Ala Leu Leu Asn Tyr Ser Ala Ser Thr Pro Val Gly Thr
      965          970          975
Pro Ala Val Leu Pro Gly Ser Arg Pro Ala Val Leu Pro Asp Gly Thr
      980          985          990
Val Thr Ser Ala Asn Phe Ala Val His Trp Thr Lys Pro Ala Asp Thr
      995          1000          1005
Val Tyr Asn Thr Ala Gly Thr Val Lys Val Pro Gly Thr Ala Thr Val
      1010          1015          1020
Phe Gly Lys Glu Phe Lys Val Thr Ala Thr Ile Arg Val Gln Arg Ser
      1025          1030          1035          1040
Gln Val Thr Ile Gly Ser Ser Val Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Thr
      1045          1050          1055
Gln Asn Ile Pro Ala Asp Lys Gln Ser Asp Thr Leu Asp Ala Ile Lys
      1060          1065          1070
Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro
      1075          1080          1085
Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala
      1090          1095          1100
Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val
      1105          1110          1115          1120
Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly
      1125          1130          1135
Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu
      1140          1145          1150
Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys
      1155          1160          1165
Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val
      1170          1175          1180
Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala
      1185          1190          1195          1200
Gly Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr
      1205          1210

```

```

<210> 6
<211> 1296
<212> PRT
5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..1296
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

```

```

10 <400> 6

Val Glu Asp Ala Thr Arg Ser Asp Ser Thr Thr Gln Met Ser Ser Thr
1      5      10      15
Pro Glu Val Val Tyr Ser Ser Ala Val Asp Ser Lys Gln Asn Arg Thr
      20      25      30
Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser Asp Ser Val Gln
      35      40      45
Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln Gln Val Asp Leu

```

ES 2 650 444 T3

50	55	60
Pro His Asp Tyr Ser	Ile Thr Gln Lys Tyr Ser	Gln Ser Asn Glu Ala
65	70	75
Glu Ser Ala Tyr Leu	Pro Gly Gly Thr Gly Trp	Tyr Arg Lys Ser Phe
85	90	95
Thr Ile Asp Arg Asp	Leu Ala Gly Lys Arg Ile	Ala Ile Asn Phe Asp
100	105	110
Gly Val Tyr Met Asn	Ala Thr Val Trp Phe Asn	Gly Val Lys Leu Gly
115	120	125
Thr His Pro Tyr Gly	Tyr Ser Pro Phe Ser Phe	Asp Leu Thr Gly Asn
130	135	140
Ala Lys Phe Gly Gly	Glu Asn Thr Ile Val Val	Lys Val Glu Asn Arg
145	150	155
Leu Pro Ser Ser Arg	Trp Tyr Ser Gly Ser Gly	Ile Tyr Arg Asp Val
165	170	175
Thr Leu Thr Val Thr	Asp Gly Val His Val Gly	Asn Asn Gly Val Ala
180	185	190
Ile Lys Thr Pro Ser	Leu Ala Thr Gln Asn Gly	Gly Asp Val Thr Met
195	200	205
Asn Leu Thr Thr Lys	Val Ala Asn Asp Thr Glu	Ala Ala Ala Asn Ile
210	215	220
Thr Leu Lys Gln Thr	Val Phe Pro Lys Gly Gly	Lys Thr Asp Ala Ala
225	230	235
Ile Gly Thr Val Thr	Thr Ala Ser Lys Ser Ile	Ala Ala Gly Ala Ser
245	250	255
Ala Asp Val Thr Ser	Thr Ile Thr Ala Ala Ser	Pro Lys Leu Trp Ser
260	265	270
Ile Lys Asn Pro Asn	Leu Tyr Thr Val Arg Thr	Glu Val Leu Asn Gly
275	280	285
Gly Lys Val Leu Asp	Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr	Gly Phe Arg Trp Thr
290	295	300
Gly Phe Asp Ala Thr	Ser Gly Phe Ser Leu Asn	Gly Glu Lys Val Lys
305	310	315
Leu Lys Gly Val Ser	Met His His Asp Gln Gly	Ser Leu Gly Ala Val
325	330	335
Ala Asn Arg Arg Ala	Ile Glu Arg Gln Val Glu	Ile Leu Gln Lys Met
340	345	350
Gly Val Asn Ser Ile	Arg Thr Thr His Asn Pro	Ala Ala Lys Ala Leu
355	360	365
Ile Asp Val Cys Asn	Glu Lys Gly Val Leu Val	Val Glu Glu Val Phe
370	375	380
Asp Met Trp Asn Arg	Ser Lys Asn Gly Asn Thr	Glu Asp Tyr Gly Lys
385	390	395
Trp Phe Gly Gln Ala	Ile Ala Gly Asp Asn Ala	Val Leu Gly Gly Asp
405	410	415
Lys Asp Glu Thr Trp	Ala Lys Phe Asp Leu Thr	Ser Thr Ile Asn Arg
420	425	430
Asp Arg Asn Ala Pro	Ser Val Ile Met Trp Ser	Leu Gly Asn Glu Met
435	440	445
Met Glu Gly Ile Ser	Gly Ser Val Ser Gly Phe	Pro Ala Thr Ser Ala
450	455	460
Lys Leu Val Ala Trp	Thr Lys Ala Ala Asp Ser	Thr Arg Pro Met Thr
465	470	475
Tyr Gly Asp Asn Lys	Ile Lys Ala Asn Trp Asn	Glu Ser Asn Thr Met
485	490	495
Gly Asp Asn Leu Thr	Ala Asn Gly Gly Val Val	Gly Thr Asn Tyr Ser
500	505	510
Asp Gly Ala Asn Tyr	Asp Lys Ile Arg Thr Thr	His Pro Ser Trp Ala
515	520	525
Ile Tyr Gly Ser Glu	Thr Ala Ser Ala Ile Asn	Ser Arg Gly Ile Tyr
530	535	540
Asn Arg Thr Thr Gly	Gly Ala Gln Ser Ser Asp	Lys Gln Leu Thr Ser
545	550	555
		560

Tyr	Asp	Asn	Ser	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ala	Trp	565	570	575
Tyr	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr	580	585	590
Gly	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Pro	Trp	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser	595	600	605
Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Pro	Ser	Pro	Lys	Asn	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile	610	615	620
Val	Asp	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Ser	625	630	635
Gln	Trp	Asn	Asp	Asp	Val	His	Thr	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Ala	Trp	Asn	645	650	655
Glu	Asn	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Asn	Val	Pro	Val	Val	Val	660	665	670
Tyr	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Gly	Ser	675	680	685
Thr	Glu	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Lys	Lys	Thr	Thr	690	695	700
Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Asp	Ser	705	710	715
Thr	Ala	His	Lys	Asn	Met	Tyr	Leu	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Trp	Ala	Glu	725	730	735
Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ile	Pro	740	745	750
Glu	Gly	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Ala	755	760	765
Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gly	770	775	780
Lys	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ile	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly	His	785	790	795
Ile	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Thr	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Ala	805	810	815
Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Ser	Pro	Asp	His	Asp	Ser	820	825	830
Tyr	Gln	Ala	Asp	Asn	Arg	Lys	Ala	Phe	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Ala	Ile	835	840	845
Val	Gln	Ser	Thr	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Lys	Ala	850	855	860
Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Thr	Val	Lys	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	Val	Pro	865	870	875
Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Lys	Thr	Val	Arg	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Arg	Asn	885	890	895
Tyr	Tyr	Val	Lys	Thr	Gly	Asn	Lys	Pro	Ile	Leu	Pro	Ser	Asp	Val	Glu	900	905	910
Val	Arg	Tyr	Ser	Asp	Gly	Thr	Ser	Asp	Arg	Gln	Asn	Val	Thr	Trp	Asp	915	920	925
Ala	Val	Ser	Asp	Asp	Gln	Ile	Ala	Lys	Ala	Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Ala	930	935	940
Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Gln	Lys	Ile	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Met	Ile	Asp	945	950	955
Glu	Ile	Gly	Ala	Leu	Leu	Asn	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	Pro	Val	Gly	Thr	965	970	975
Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Thr	980	985	990
Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Phe	Ala	Val	His	Trp	Thr	Lys	Pro	Ala	Asp	Thr	995	1000	1005
Val	Tyr	Asn	Thr	Ala	Gly	Thr	Val	Lys	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	1010	1015	1020
Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Ile	Arg	Val	Gln	Arg	Ser	1025	1030	1035
Gln	Val	Thr	Ile	Gly	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Ala	Leu	Arg	Leu	Thr	1045	1050	1055
Gln	Asn	Ile	Pro	Ala	Asp	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	Leu	Asp	Ala	Ile	Lys			

```

1060      1065      1070
Asp Gly Ser Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Gly Gly Gly Ala Asn Pro
1075      1080      1085
Ser Ala Trp Thr Asn Trp Ala Tyr Ser Lys Ala Gly His Asn Thr Ala
1090      1095      1100
Glu Ile Thr Phe Glu Tyr Ala Thr Glu Gln Gln Leu Gly Gln Ile Val
1105      1110      1115      1120
Met Tyr Phe Phe Arg Asp Ser Asn Ala Val Arg Phe Pro Asp Ala Gly
1125      1130      1135
Lys Thr Lys Ile Gln Ile Ser Ala Asp Gly Lys Asn Trp Thr Asp Leu
1140      1145      1150
Ala Ala Thr Glu Thr Ile Ala Ala Gln Glu Ser Ser Asp Arg Val Lys
1155      1160      1165
Pro Tyr Thr Tyr Asp Phe Ala Pro Val Gly Ala Thr Phe Val Lys Val
1170      1175      1180
Thr Val Thr Asn Ala Asp Thr Thr Thr Pro Ser Gly Val Val Cys Ala
1185      1190      1195      1200
Gly Leu Thr Glu Ile Glu Leu Lys Thr Ala Thr Ser Lys Phe Val Thr
1205      1210      1215
Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Ser Leu Thr Val Asn Gly Thr Lys Val
1220      1225      1230
Ser Asp Ser Val Leu Ala Ala Gly Ser Tyr Asn Thr Pro Ala Ile Ile
1235      1240      1245
Ala Asp Val Lys Ala Glu Gly Glu Gly Asn Ala Ser Val Thr Val Leu
1250      1255      1260
Pro Ala His Asp Asn Val Ile Arg Val Ile Thr Glu Ser Glu Asp His
1265      1270      1275      1280
Val Thr Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe
1285      1290      1295

```

<210> 7

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> FUENTE

<222> 1.453

10 <223> /tipo de molécula ="proteína" /nota="Núcleo catalítico de glucósido hidrolasa "/organismo="Bifidobacterium bifidum"

<400> 7

```

Gln Asn Arg Thr Ser Asp Phe Asp Ala Asn Trp Lys Phe Met Leu Ser
1      5      10      15
Asp Ser Val Gln Ala Gln Asp Pro Ala Phe Asp Asp Ser Ala Trp Gln
20      25      30
Gln Val Asp Leu Pro His Asp Tyr Ser Ile Thr Gln Lys Tyr Ser Gln
35      40      45
Ser Asn Glu Ala Glu Ser Ala Tyr Leu Pro Gly Gly Thr Gly Trp Tyr
50      55      60
Arg Lys Ser Phe Thr Ile Asp Arg Asp Leu Ala Gly Lys Arg Ile Ala
65      70      75      80
Ile Asn Phe Asp Gly Val Tyr Met Asn Ala Thr Val Trp Phe Asn Gly
85      90      95
Val Lys Leu Gly Thr His Pro Tyr Gly Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Asp
100      105      110
Leu Thr Gly Asn Ala Lys Phe Gly Gly Glu Asn Thr Ile Val Val Lys
115      120      125
Val Glu Asn Arg Leu Pro Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Gly Ser Gly Ile
130      135      140
Tyr Arg Asp Val Thr Leu Thr Val Thr Asp Gly Val His Val Gly Asn
145      150      155      160

```

Asn Gly Val Ala Ile Lys Thr Pro Ser Leu Ala Thr Gln Asn Gly Gly
165 170 175
Asp Val Thr Met Asn Leu Thr Thr Lys Val Ala Asn Asp Thr Glu Ala
180 185 190
Ala Ala Asn Ile Thr Leu Lys Gln Thr Val Phe Pro Lys Gly Gly Lys
195 200 205
Thr Asp Ala Ala Ile Gly Thr Val Thr Thr Ala Ser Lys Ser Ile Ala
210 215 220
Ala Gly Ala Ser Ala Asp Val Thr Ser Thr Ile Thr Ala Ala Ser Pro
225 230 235 240
Lys Leu Trp Ser Ile Lys Asn Pro Asn Leu Tyr Thr Val Arg Thr Glu
245 250 255
Val Leu Asn Gly Gly Lys Val Leu Asp Thr Tyr Asp Thr Glu Tyr Gly
260 265 270
Phe Arg Trp Thr Gly Phe Asp Ala Thr Ser Gly Phe Ser Leu Asn Gly
275 280 285
Glu Lys Val Lys Leu Lys Gly Val Ser Met His His Asp Gln Gly Ser
290 295 300
Leu Gly Ala Val Ala Asn Arg Arg Ala Ile Glu Arg Gln Val Glu Ile
305 310 315 320
Leu Gln Lys Met Gly Val Asn Ser Ile Arg Thr Thr His Asn Pro Ala
325 330 335
Ala Lys Ala Leu Ile Asp Val Cys Asn Glu Lys Gly Val Leu Val Val
340 345 350
Glu Glu Val Phe Asp Met Trp Asn Arg Ser Lys Asn Gly Asn Thr Glu
355 360 365
Asp Tyr Gly Lys Trp Phe Gly Gln Ala Ile Ala Gly Asp Asn Ala Val
370 375 380
Leu Gly Gly Asp Lys Asp Glu Thr Trp Ala Lys Phe Asp Leu Thr Ser
385 390 395 400
Thr Ile Asn Arg Asp Arg Asn Ala Pro Ser Val Ile Met Trp Ser Leu
405 410 415
Gly Asn Glu Met Met Glu Gly Ile Ser Gly Ser Val Ser Gly Phe Pro
420 425 430
Ala Thr Ser Ala Lys Leu Val Ala Trp Thr Lys Ala Ala Asp Ser Thr
435 440 445
Arg Pro Met Thr Tyr
450

<210> 8

<211> 5160

<212> ADN

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> fuente

<222> 1..5160

<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 8

gcagttgaag atgcaacaag aagcgatagc acaacacaaa tgtcatcaac accggaagtt 60
gtttattcat cagcggtcga tagcaaaca aatcgcacaa gcgattttga tgcgaactgg 120
aaatttatgc tgtcagatag cgttcaagca caagatccgg catttgatga ttcagcatgg 180
caacaagttg atctgccgca tgattatagc atcacacaga aatatagcca aagcaatgaa 240
gcagaatcag catatcttcc gggaggcaca ggctgggtata gaaaaagctt tacaattgat 300
agagatctgg caggcaaacg cattgcgatt aattttgatg gcgtctatat gaatgcaaca 360

ES 2 650 444 T3

gtctggttta	atggcgtaa	actgggcaca	catccgtatg	gctattcacc	gttttcattt	420
gatctgacag	gcaatgcaaa	atttggcgga	gaaaacacaa	ttgtcgtcaa	agttgaaaat	480
agactgccgt	catcaagatg	gtattcaggc	agcggcattt	atagagatgt	tacactgaca	540
gttacagatg	gcgttcatgt	tggcaataat	ggcgtcgcaa	ttaaaacacc	gtcactggca	600
acacaaaatg	gcggagatgt	cacaatgaac	ctgacaacaa	aagtcgcgaa	tgatacagaa	660
gcagcagcga	acattacact	gaaacagaca	gtttttccga	aaggcggaaa	aacggatgca	720
gcaattggca	cagttacaac	agcatcaaaa	tcaattgcag	caggcgcata	agcagatggt	780
acaagcacia	ttacagcagc	aagcccgaaa	ctgtgggtcaa	ttaaaaaccc	gaacctgtat	840
acagttagaa	cagaagttct	gaacggaggc	aaagttcttg	atacatatga	tacagaatat	900
ggctttcgct	ggacaggctt	tgatgcaaca	tcaggctttt	caactgaatg	cgaaaaagtc	960
aaactgaaag	gcgttagcat	gcatacatgat	caaggctcac	ttggcgcagt	tgcaaataga	1020
cgcgcaattg	aaagacaagt	cgaaatcctg	caaaaaatgg	gcgtcaatag	cattcgcaca	1080
acacataatc	cggcagcaaa	agcactgatt	gatgtctgca	atgaaaaagg	cgttctgggt	1140
gtcgaagaag	tctttgatat	gtggaaccgc	agcaaaaatg	gcaacacgga	agattatggc	1200
aaatggtttg	gccaaagcaat	tgacggcgat	aatgcagttc	tgggaggcga	taaagatgaa	1260
acatgggcca	aatttgatct	tacatcaaca	attaaccgcg	atagaaatgc	accgtcagtt	1320
attatgtggt	caactgggcaa	tgaaatgatg	gaaggcattt	caggctcagt	ttcaggcttt	1380
cgggcaacat	cagcaaaact	ggttgcattg	acaaaagcag	cagattcaac	aagaccgatg	1440
acatatggcg	ataacaaaat	taaagcgaac	tggaacgaat	caaatacaat	gggcgataat	1500
ctgacagcaa	atggcggagt	tgattggcaca	aattattcag	atggcgcaaa	ctatgataaa	1560
attcgtacaa	cacatccgtc	atgggcaatt	tatggctcag	aaacagcatc	agcgattaat	1620
agccgtggca	tttataatag	aacaacaggc	ggagcacaat	catcagataa	acagctgaca	1680
agctatgata	attcagcagt	tggctgggga	gcagttgcat	catcagcatg	gtatgatggt	1740
gttcagagag	attttgtcgc	aggcacatat	gtttggacag	gatttgatta	tctgggcgaa	1800
cgcacaccgt	ggaatggcac	aggctcaggc	gcagttggct	catggccgtc	accgaaaaat	1860
agctattttg	gcatacgttg	tacagcaggc	tttccgaaag	atacatatta	tttttatcag	1920
agccagtgga	atgatgatgt	tcatacactg	catattcttc	cggcatggaa	tgaaaatggt	1980
gttgcaaaag	gctcaggcaa	taatgttccg	gttgctcgtt	atacagatgc	agcgaaagtg	2040
aaactgtatt	ttacaccgaa	aggctcaaca	gaaaaaagac	tgatcggcga	aaaatcattt	2100
acaaaaaaaa	caacagcggc	aggctataca	tatcaagtct	atgaaggcag	cgataaagat	2160
tcaacagcgc	ataaaaacat	gtatctgaca	tggaatgttc	cgtgggcaga	aggcacaatt	2220
tcagcgggaag	cgtatgatga	aaataatcgc	ctgattccgg	aaggcagcac	agaaggcaac	2280

ES 2 650 444 T3

gcatcagtta	caacaacagg	caaagcagca	aaactgaaag	cagatgcgga	tcgcaaaaca	2340
attacagcgg	atggcaaaga	tctgtcatat	attgaagtcg	atgtcacaga	tgcaaattggc	2400
catattgttc	cggatgcagc	aaatagagtc	acatttgatg	ttaaaggcgc	aggcaaactg	2460
gttggcggtt	ataatggctc	atcaccggat	catgattcat	atcaagcggg	taaccgcaaa	2520
gcattttcag	gcaaagtcct	ggcaattggt	cagtcaacaa	aagaagcagg	cgaaattaca	2580
gttacagcaa	aagcagatgg	cctgcaatca	agcacagtta	aaattgcaac	aacagcagtt	2640
ccgggaacaa	gcacagaaaa	aacagtccgc	agctttttatt	acagccgcaa	ctattatgtc	2700
aaaacaggca	acaaaccgat	tctgccgtca	gatgttgaag	ttcgctattc	agatggaaca	2760
agcgatagac	aaaacgttac	atgggatgca	gtttcagatg	atcaaattgc	aaaagcaggc	2820
tcattttcag	ttgcaggcac	agttgcaggc	caaaaaatta	gcgttcgcgt	cacaatgatt	2880
gatgaaattg	gcgcactgct	gaattattca	gcaagcacac	cggttggcac	accggcagtt	2940
cttcgggat	caagaccggc	agtcctgccg	gatggcacag	tcacatcagc	aaattttgca	3000
gtccattgga	caaaaccggc	agatacagtc	tataatacag	caggcacagt	caaagtaccg	3060
ggaacagcaa	cagtttttgg	caaagaattt	aaagtcacag	cgacaattag	agttcaaaga	3120
agccaagtta	caattggctc	atcagtttca	ggaaatgcac	tgagactgac	acaaaatatt	3180
ccggcagata	aacaatcaga	tacactggat	gcgattaaag	atggctcaac	aacagttgat	3240
gcaaatacag	gcggaggcgc	aatccgtca	gcatggacaa	attgggcata	ttcaaaagca	3300
ggccataaca	cagcggaaat	tacatttgaa	tatgcgacag	aacaacaact	gggccagatc	3360
gtcatgtatt	tttttcgcga	tagcaatgca	gttagatttc	cggatgctgg	caaaacaaaa	3420
attcagatca	gcgcagatgg	caaaaattgg	acagatctgg	cagcaacaga	aacaattgca	3480
gcgcaagaat	caagcgatag	agtcaaaccg	tatacatatg	attttgcacc	ggttggcgca	3540
acatttggtta	aagtgacagt	cacaaacgca	gatacaacaa	caccgtcagg	cgttgtttgc	3600
gcaggcctga	cagaaattga	actgaaaaca	gcgacaagca	aatttgtcac	aaatacatca	3660
gcagcactgt	catcacttac	agtcaatggc	acaaaagtgt	cagattcagt	tctggcagca	3720
ggctcatata	acacaccggc	aattatcgca	gatgttaaag	cggaaggcga	aggcaatgca	3780
agcgttacag	tccttccggc	acatgataat	gttattcgcg	tcattacaga	aagcgaagat	3840
catgtcacac	gcaaaacatt	tacaatcaac	ctgggcacag	aacaagaatt	tccggctgat	3900
tcagatgaaa	gagattatcc	ggcagcagat	atgacagtca	cagttggctc	agaacaaaca	3960
tcaggcacag	caacagaagg	accgaaaaaa	tttgcatgct	atggcaacac	atcaacatat	4020
tggcatagca	attggacacc	gacaacagtt	aatgatctgt	ggatcgcggt	tgaactgcaa	4080
aaaccgacaa	aactggatgc	actgagatat	cttcgcgcgc	cggcaggctc	aaaaaatggc	4140

agcgtcacag aatataaagt tcaggtgtca gatgatggaa caaactggac agatgcaggc 4200
tcaggcacat ggacaacgga ttatggctgg aaactggcgg aatttaataca accggtcaca 4260
acaaaacatg ttagactgaa agcggttcat acatatgcag atagcggcaa cgataaattt 4320
atgagcgcaa gcgaaattag actgagaaaa gcggtcgata caacggatat ttcaggcgca 4380
acagttacag ttccggcaaa actgacagtt gatagagttg atgcagatca tccggcaaca 4440
tttgcaacaa aagatgtcac agttacactg ggagatgcaa cactgagata tggcgttgat 4500
tatctgctgg attatgcagg caatacagca gttggcaaag caacagtgac agttagaggc 4560
attgataaat attcaggcac agtcgcgaaa acatttaciaa ttgaactgaa aaatgcaccg 4620
gcaccggaac cgacactgac atcagttagc gtcaaaaaca aaccgagcaa actgacatat 4680
gttgtcggag atgcatttga tccggcaggc ctggttctgc aacatgatag acaagcagat 4740
agacctccgc aaccgctggt tggcgaacaa gcggatgaac gcggactgac atgcggcaca 4800
agatgcgata gaggttgaaca actgcgcaaa catgaaaata gagaagcgca tagaacaggc 4860
ctggatcatc tggaatttgt tggcgagca gatggcgagc ttggagaaca agcaacattt 4920
aaagtccatg tccatgcaga tcaggagat ggcagacatg atgatgcaga tgaacgcgat 4980
attgatccgc atgttccggt cgatcatgca gttggcgaac tggcaagagc agcatgccat 5040
catgttattg gcctgagagt cgatacacat agacttaaag caagcggctt tcaaattccg 5100
gctgatgata tggcagaaat cgatcgcatt acaggctttc atcgttttga acgccatgac 5160

<210> 9

<211> 2661

<212> ADN

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> fuente

<222> 1..2661

<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 9

gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttgtt 60
tattcatcag cggctgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa 120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacia gatccggcat ttgatgattc agcatggcaa 180
caagttgatc tgccgcatga ttatagcatc acacagaaat atagccaaag caatgaagca 240
gaatcagcat atcttccggg aggcacaggc tggatataga aaagctttac aattgataga 300
gatctggcag gcaaacgcac tgcgattaat tttgatggcg tctatatgaa tgcaacagtc 360
tggtttaaatg gcgttaaact gggcacacat ccgtatggct attcaccgtt ttcatttgat 420
ctgacaggca atgcaaaatt tggcggagaa aacacaattg tcgtcaaagt tgaaaataga 480

ES 2 650 444 T3

ctgccgtcat	caagatggta	ttcaggcagc	ggcatttata	gagatgttac	actgacagtt	540
acagatggcg	ttcatgttgg	caataatggc	gtcgcgaatta	aaacaccgtc	actggcaaca	600
caaaatggcg	gagatgtcac	aatgaacctg	acaacaaaag	tcgcgaatga	tacagaagca	660
gcagcgaaca	ttacactgaa	acagacagtt	tttccgaaag	gcggaaaaac	ggatgcagca	720
attggcacag	ttacaacagc	atcaaaatca	attgcagcag	gcgcatcagc	agatgttaca	780
agcacaatta	cagcagcaag	cccgaaactg	tggtcaatta	aaaacccgaa	cctgtatata	840
gttagaacag	aagttctgaa	cggaggcaaa	gttctggata	catatgatac	agaatatggc	900
tttcgctgga	caggctttga	tgcaacatca	ggcttttcac	tgaatggcga	aaaagtcaaa	960
ctgaaaggcg	ttagcatgca	tcatgatcaa	ggctcacttg	gcgcagttgc	aaatagacgc	1020
gcaattgaaa	gacaagtcga	aatcctgcaa	aaaatgggcg	tcaatagcat	tcgcacaaca	1080
cataatccgg	cagcaaaagc	actgattgat	gtctgcaatg	aaaaaggcgt	tctggttgct	1140
gaagaagtct	ttgatatgtg	gaaccgcagc	aaaaatggca	acacggaaga	ttatggcaaa	1200
tggtttggcc	aagcaattgc	aggcgataat	gcagttctgg	gaggcgataa	agatgaaaca	1260
tgggcgaaat	ttgatcttac	atcaacaatt	aaccgcgata	gaaatgcacc	gtcagttatt	1320
atgtggtcac	tgggcaatga	aatgatggaa	ggcatttcag	gctcagtttc	aggctttccg	1380
gcaacatcag	caaaactggt	tgcatggaca	aaagcagcag	attcaacaag	accgatgaca	1440
tatggcgata	acaaaattaa	agcgaactgg	aacgaatcaa	atacaatggg	cgataatctg	1500
acagcaaatg	gcggagttgt	tggcacaaat	tattcagatg	gcgcaaacta	tgataaaatt	1560
cgtacaacac	atccgtcatg	ggcaatttat	ggctcagaaa	cagcatcagc	gattaatagc	1620
cgtggcattt	ataatagaac	aacaggcgga	gcacaatcat	cagataaaca	gctgacaagc	1680
tatgataatt	cagcagttgg	ctggggagca	gttgcatcat	cagcatggta	tgatgttggt	1740
cagagagatt	ttgtcgcagg	cacatatggt	tggacaggat	ttgattatct	gggcgaaccg	1800
acaccgtgga	atggcacagg	ctcaggcgca	gttggctcat	ggccgtcacc	gaaaaatagc	1860
tattttggca	tcgttgatac	agcaggcttt	ccgaaagata	catattattt	ttatcagagc	1920
cagtggaatg	atgatgttca	tacactgcat	attcttccgg	catggaatga	aaatgttggt	1980
gcaaaaggct	caggcaataa	tggtccgggt	gtcgtttata	cagatgcagc	gaaagtgaaa	2040
ctgtatttta	caccgaaagg	ctcaacagaa	aaaagactga	tcggcgaaaa	atcattttaca	2100
aaaaaaacaa	cagcggcagg	ctatacatat	caagtctatg	aaggcagcga	taaagattca	2160
acagcgcata	aaaacatgta	tctgacatgg	aatgttccgt	gggcagaagg	cacaattttca	2220
gcggaagcgt	atgatgaaaa	taatcgcctg	attccggaag	gcagcacaga	aggcaacgca	2280
tcagttacaa	caacaggcaa	agcagcaaaa	ctgaaagcag	atgcggatcg	caaaacaatt	2340
acagcggatg	gcaaagatct	gtcatatat	gaagtcgatg	tcacagatgc	aaatggccat	2400

ES 2 650 444 T3

```

attgttccgg atgcagcaaa tagagtcaca tttgatgtta aaggcgcagg caaactgggtt 2460
ggcgttgata atggctcatc accggatcat gattcatatc aagcggataa ccgcaaagca 2520
ttttcaggca aagtcctggc aattgttcag tcaacaaaag aagcaggcga aattacagtt 2580
acagcaaaaag cagatggcct gcaatcaagc acagttaaaa ttgcaacaac agcagttccg 2640
ggaacaagca cagaaaaaac a 2661
<210> 10
<211> 2895
<212> ADN
5 <213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> fuente
<222> 1..2895
<223> /tipo de molécula ="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
10 <400> 10
gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttggt 60
tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa 120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcaca gatccggcat ttgatgattc agcatggcaa 180
caagttgatc tgccgcatga ttatagcatc acacagaaat atagccaaag caatgaagca 240
gaatcagcat atcttccggg aggcacaggc tggatataga aaagctttac aattgataga 300
gatctggcag gcaaacgcat tgcgattaat tttgatggcg tctatatgaa tgcaacagtc 360
tggtttaatg gcgttaaact gggcacacat ccgtatggct attcaccgtt ttcatttgat 420
ctgacaggca atgcaaaatt tggcggagaa aacacaattg tcgtcaaagt tgaaaataga 480
ctgccgtcat caagatggta ttcaggcagc ggcatattata gagatgttac actgacagtt 540
acagatggcg ttcattgttg caataatggc gtcgcaatta aaacaccgtc actggcaaca 600
caaaatggcg gagatgtcac aatgaacctg acaacaaaag tcgcgaatga tacagaagca 660
gcagcgaaca ttacactgaa acagacagtt tttccgaaag gcggaaaaac ggatgcagca 720
attggcacag ttacaacagc atcaaaaatca attgcagcag gcgcatcagc agatgttaca 780
agcacaatta cagcagcaag cccgaaactg tggatcaatta aaaacccgaa cctgtatata 840
gttagaacag aagttctgaa cggaggcaaa gttctggata catatgatac agaatatggc 900
tttcgctgga caggctttga tgcaacatca ggcttttcac tgaatggcga aaaagtcaaa 960
ctgaaaggcg ttagcatgca tcatgatcaa ggctcacttg gcgcagttgc aaatagacgc 1020
gcaattgaaa gacaagtcga aatcctgcaa aaaatgggcg tcaatagcat tcgcacaaca 1080
cataatccgg cagcaaaaagc actgattgat gtctgcaatg aaaaaggcgt tctggttgtc 1140
gaagaagtct ttgatatgtg gaaccgcagc aaaaatggca acacggaaga ttatggcaaa 1200

```

ES 2 650 444 T3

tgggtttggcc aagcaattgc aggcgataat gcagttcttg gaggcgataa agatgaaaca 1260
 tgggcgaaat ttgatcttac atcaacaatt aaccgcgata gaaatgcacc gtcagttatt 1320
 atgtggtcac tgggcaatga aatgatggaa ggcatttcag gctcagtttc aggctttccg 1380
 gcaacatcag caaaactggt tgcattggaca aaagcagcag attcaacaag accgatgaca 1440
 tatggcgata acaaaattaa agcgaactgg aacgaatcaa atacaatggg cgataatctg 1500
 acagcaaatg gcggagttgt tggcacaaat tattcagatg gcgcaaacta tgataaaatt 1560
 cgtacaacac atccgtcatg ggcaatttat ggctcagaaa cagcatcagc gattaatagc 1620
 cgtggcattt ataatagaac aacaggcgga gcacaatcat cagataaaca gctgacaagc 1680
 tatgataatt cagcagttgg ctggggagca gttgcatcat cagcatggta tgatgttgtt 1740
 cagagagatt ttgtcgcagg cacatatgtt tggacaggat ttgattatct gggcgaaccg 1800
 acaccgtgga atggcacagg ctccaggcgca gttggctcat ggccgtcacc gaaaaatagc 1860
 tattttggca tcgttgatac agcaggcttt ccgaaagata catattattt ttatcagagc 1920
 cagtggaatg atgatgttca tacactgcat attcttccgg catggaatga aaatgttgtt 1980
 gcaaaaggct caggcaataa tgttccggtt gtcgtttata cagatgcagc gaaagtgaaa 2040
 ctgtatttta caccgaaagg ctcaacagaa aaaagactga tcggcgaaaa atcatttaca 2100
 aaaaaaaca cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160
 acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220
 gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcttg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280
 tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340
 acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtogatg tcacagatgc aaatggccat 2400
 attgttccgg atgcagcaaa tagagtcaca tttgatgtta aaggcgcagg caaactggtt 2460
 ggcgttgata atggctcatc accggatcat gattcatatc aagcggataa ccgcaaagca 2520
 ttttcaggca aagtcctggc aattgttcag tcaacaaaag aagcaggcga aattacagtt 2580
 acagcaaaag cagatggcct gcaatcaagc acagttaaaa ttgcaacaac agcagttccg 2640
 ggaacaagca cagaaaaaac agtccgcagc ttttattaca gccgcaacta ttatgtcaaa 2700
 acaggcaaca aaccgattct gccgtcagat gttgaagttc gctattcaga tggacaagc 2760
 gatagacaaa acgttacatg ggatgcagtt tcagatgatc aaattgcaa agcaggctca 2820
 ttttcagttg caggcacagt tgcaggccaa aaaattagcg ttccggtcac aatgattgat 2880
 gaaattggcg cactg 2895

<210> 11
 <211> 3114
 <212> ADN
 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> fuente

ES 2 650 444 T3

<222> 1..3114

<223> /tipo de molécula ="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

<400> 11

gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttgtt	60
tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa	120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacia gatccggcat ttgatgattc agcatggcaa	180
caagttgatc tgccgcatga ttatagcatc acacagaaat atagccaaag caatgaagca	240
gaatcagcat atcttccggg aggcacaggc tggatataga aaagctttac aattgataga	300
gatctggcag gcaaacgcat tgcgattaat tttgatggcg tctatatgaa tgcaacagtc	360
tggtttaatg gcgttaaact gggcacacat ccgtatggct attcacggtt ttcatttgat	420
ctgacaggca atgcaaaatt tggcggagaa aacacaattg tcgtcaaagt tgaaaataga	480
ctgccgtcat caagatggta ttcaggcagc ggcatttata gagatgttac actgacagtt	540
acagatggcg ttcattgttg caataatggc gtcgcaatta aaacaccgtc actggcaaca	600
caaatggcg gagatgtcac aatgaacctg acaacaaaag tcgcgaatga tacagaagca	660
gcagcgaaca ttacttgaa acagacagtt tttccgaaag gcggaaaaac ggatgcagca	720
attggcacag ttacaacagc atcaaatca attgcagcag gcgcacagc agatgttaca	780
agcacaatta cagcagcaag cccgaaactg tggtaatta aaaacccgaa cctgtataga	840
gttagaacag aagttctgaa cggaggcaaa gttctggata catatgatac agaatatggc	900
tttcgctgga caggctttga tgcaacatca ggcttttcac tgaatggcga aaaagtcaaa	960
ctgaaaggcg ttagcatgca tcatgatcaa ggctcacttg gcgcagttgc aaatagacgc	1020
gcaattgaaa gacaagtcga aatcctgcaa aaaatggcg tcaatagcat tcgcacaaca	1080
cataatccgg cagcaaaagc actgattgat gtctgcaatg aaaaaggcgt tctggttgtc	1140
gaagaagtct ttgatatgtg gaaccgcagc aaaaatggca acacggaaga ttatggcaaa	1200
tggtttgcc aagcaattgc aggcgataat gcagttctgg gaggcgataa agatgaaaca	1260
tgggcgaaat ttgatcttac atcaacaatt aaccgcgata gaaatgcacc gtcagttatt	1320
atgtggtcac tgggcaatga aatgatggaa ggcatttcag gctcagtttc aggctttccg	1380
gcaacatcag caaaactggc tgcatggaca aaagcagcag attcaacaag accgatgaca	1440
tatggcgata acaaaattaa agcgaactgg aacgaatcaa atacaatggg cgataatctg	1500
acagcaaatg gcggagttgt tggcaciaat tattcagatg gcgcaacta tgataaaatt	1560
cgtacaacac atccgtcatg ggcaatttat ggctcagaaa cagcatcagc gattaatagc	1620

ES 2 650 444 T3

```

cgtggcattt ataatagaac aacaggcgga gcacaatcat cagataaaca gctgacaagc 1680
tatgataatt cagcagttgg ctgggggagca gttgcatcat cagcatggta tgatgttggt 1740
cagagagatt ttgtcgcagg cacatatgtt tggacaggat ttgattatct gggcgaaccg 1800
acaccgtgga atggcacagg ctcaggcgca gttggctcat ggccgtcacc gaaaaatagc 1860
tatttttgga tcgttgatac agcaggcttt ccgaaagata catattatct ttatcagagc 1920
cagtgggaatg atgatgttca tacctgcat attcttccgg catggaatga aaatgttggt 1980
gcaaaaggct caggcaataa tggtccgggt gtcgtttata cagatgcagc gaaagtga 2040
ctgtatttta caccgaaagg ctcaacagaa aaaagactga tcggcgaaaa atcatttaca 2100
aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160
acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220
gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcttg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280
tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340
acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg tcacagatgc aaatggccat 2400
attgttccgg atgcagcaaa tagagtcaca tttgatgtta aaggcgagg caaactgggt 2460
ggcgttgata atggctcatc accggatcat gattcatatc aagcggataa ccgcaaagca 2520
ttttcaggca aagtcctggc aattgttcag tcaacaaaag aagcaggcga aattacagtt 2580
acagcaaaag cagatggcct gcaatcaagc acagttaaaa ttgcaacaac agcagttccg 2640
ggaacaagca cagaaaaaac agtccgcagc ttttattaca gccgcaacta ttatgtcaaa 2700
acaggcaaca aaccgattct gccgtcagat gttgaagttc gctattcaga tggaacaagc 2760
gatagacaaa acgttacatg ggatgcagtt tcagatgatc aaattgcaaa agcaggctca 2820
ttttcagttg caggcacagt tgcaggccaa aaaattagcg ttcgcgtcac aatgattgat 2880
gaaattggcg cactgctgaa ttattcagca agcacaccgg ttggcacacc ggcagttctt 2940
ccgggatcaa gaccggcagt cctgccggat ggcacagtca catcagcaaa ttttgcagtc 3000
cattggacaa aaccggcaga tacagtctat aatacagcag gcacagtcaa agtaccggga 3060
acagcaacag tttttggcaa agaatttaaa gtcacagcga caattagagt tcaa 3114

```

<210> 12

<211> 3426

<212> ADN

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> fuente

<222> 1..3426

<223> /tipo de molécula ="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 12

ES 2 650 444 T3

gttgaagatg	caacaagaag	cgatagcaca	acacaaatgt	catcaacacc	ggaagttggt	60
tattcatcag	cggtcgatag	caaacaaaat	cgcacaagcg	attttgatgc	gaactggaaa	120
tttatgctgt	cagatagcgt	tcaagcacia	gatccggcat	ttgatgattc	agcatggcaa	180
caagttgatc	tgccgcatga	ttatagcatc	acacagaaat	atagccaaag	caatgaagca	240
gaatcagcat	atcttccggg	aggcacaggc	tggtatagaa	aaagctttac	aattgataga	300
gatctggcag	gcaaacgcat	tgcgattaat	tttgatggcg	tctatatgaa	tgcaacagtc	360
tggtttaatg	gcgttaaact	gggcacacat	ccgtatggct	attcaccgtt	ttcatttgat	420
ctgacaggca	atgcaaaatt	tgccggagaa	aacacaattg	tcgtcaaagt	tgaaaataga	480
ctgccgtcat	caagatggta	ttcaggcagc	ggcattttata	gagatgttac	actgacagtt	540
acagatggcg	ttcatgttgg	caataatggc	gtcgcaatta	aaacaccgtc	actggcaaca	600
caaaatggcg	gagatgtcac	aatgaacctg	acaacaaaag	tcgcgaatga	tacagaagca	660
gcagcgaaca	ttacactgaa	acagacagtt	tttccgaaag	gcggaaaaaac	ggatgcagca	720
attggcacag	ttacaacagc	atcaaaatca	attgcagcag	gcgcatcagc	agatgttaca	780
agcacaatta	cagcagcaag	cccgaactg	tggtcaatta	aaaacccgaa	cctgtataca	840
gttagaacag	aagttctgaa	cggaggcaaa	gttctggata	catatgatac	agaatatggc	900
tttcgctgga	caggctttga	tgcaacatca	ggctttttcac	tgaatggcga	aaaagtcaaa	960
ctgaaaggcg	ttagcatgca	tcatgatcaa	ggctcacttg	gcgcagttgc	aaatagacgc	1020
gcaattgaaa	gacaagtcga	aatcctgcaa	aaaatgggcg	tcaatagcat	tcgcacaaca	1080
cataatccgg	cagcaaaagc	actgattgat	gtctgcaatg	aaaaaggcgt	tctggttgtc	1140
gaagaagtct	ttgatatgtg	gaaccgcagc	aaaaatggca	acacggaaga	ttatggcaaa	1200
tggtttggcc	aagcaattgc	aggcgataat	gcagttctgg	gaggcgataa	agatgaaaca	1260
tgggcgaaat	ttgatcttac	atcaacaatt	aaccgcgata	gaaatgcacc	gtcagttatt	1320
atgtgggtcac	tgggcaatga	aatgatggaa	ggcattttcag	gctcagtttc	aggctttccg	1380
gcaacatcag	caaaactggt	tgcatggaca	aaagcagcag	attcaacaag	accgatgaca	1440
tatggcgata	acaaaattaa	agcgaactgg	aacgaatcaa	atacaatggg	cgataatctg	1500
acagcaaatg	gcggagttgt	tgccacaaat	tattcagatg	gcgcaaacta	tgataaaatt	1560
cgtacaacac	atccgtcatg	ggcaatttat	ggctcagaaa	cagcatcagc	gattaatagc	1620
cgtggcattt	ataatagaac	aacaggcgga	gcacaatcat	cagataaaca	gctgacaagc	1680
tatgataatt	cagcagttgg	ctggggagca	gttgcatcat	cagcatggta	tgatgttggt	1740
cagagagatt	ttgtcgcagg	cacatatggt	tgacaggat	ttgattatct	gggcgaaccg	1800
acaccgtgga	atggcacagg	ctcaggcgca	gttggtcat	ggccgtcacc	gaaaaatagc	1860
tattttggca	tcgttgatac	agcaggcttt	ccgaaagata	catattattt	ttatcagagc	1920

ES 2 650 444 T3

cagtggaatg atgatgttca tacactgcat attcttccgg catggaatga aaatgttggtt 1980
gcaaaaggct caggcaataa tggtccgggtt gtcgtttata cagatgcagc gaaagtgaag 2040
ctgtatttta caccgaaagg ctcaacagaa aaaagactga tcggcgaaaa atcatttaca 2100
aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160
acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220
gcggaagcgt atgatgaaaa taatgccttg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280
tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340
acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtgcgatg tcacagatgc aaatggccat 2400
attgttccgg atgcagcaaa tagagtcaca tttgatgtta aaggcgcagg caaactgggtt 2460
ggcgttgata atggctcatc accggatcat gattcatatc aagcggataa ccgcaaagca 2520
ttttcaggca aagtcctggc aattgttcag tcaacaaaag aagcaggcga aattacagtt 2580
acagcaaaag cagatggcct gcaatcaagc acagttaaaa ttgcaacaac agcagttccg 2640
ggaacaagca cagaaaaaac agtccgcagc ttttattaca gccgcaacta ttatgtcaaa 2700
acaggcaaca aaccgattct gccgtcagat gttgaagttc gctattcaga tggaacaagc 2760
gatagacaaa acgttacatg ggatgcagtt tcagatgatc aaattgcaaa agcaggctca 2820
ttttcagttg caggcacagt tgcaggccaa aaaattagcg ttcgcgtcac aatgattgat 2880
gaaattggcg cactgctgaa ttattcagca agcacaccgg ttggcacacc ggcagttcctt 2940
ccgggatcaa gaccggcagt cctgccggat ggcacagtca catcagcaaa ttttgcagtc 3000
cattggacaa aaccggcaga tacagtctat aatacagcag gcacagtcaa agtaccggga 3060
acagcaacag tttttggcaa agaatttaaa gtcacagcga caattagagt tcaaagaagc 3120
caagttacaa ttggctcatc agtttcagga aatgcactga gactgacaca aaatattccg 3180
gcagataaac aatcagatac actggatgag attaaagatg gctcaacaac agttgatgca 3240
aatacaggcg gaggcgcaaa tccgtcagca tggacaaatt ggcatattc aaaagcaggc 3300
cataacacag cggaattac atttgaatat gcgacagaac aacaactggg ccagatcgtc 3360
atgtattttt ttcgcgatag caatgcagtt agatttccgg atgctggcaa aacaaaaatt 3420
cagatc 3426

<210> 13

<211> 3633

<212> ADN

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> fuente

<222> 1..3633

<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

10 <400> 13

ES 2 650 444 T3

gttgaagatg	caacaagaag	cgatagcaca	acacaaatgt	catcaacacc	ggaagttgtt	60
tattcatcag	cggtcgatag	caaacaaaat	cgcacaaagc	attttgatgc	gaactggaaa	120
tttatgctgt	cagatagcgt	tcaagcacia	gatccggcat	ttgatgattc	agcatggcaa	180
caagttgatc	tgccgcatga	ttatagcatc	acacagaaat	atagccaaag	caatgaagca	240
gaatcagcat	atcttccggg	aggcacaggc	tggtatagaa	aaagctttac	aattgataga	300
gatctggcag	gcaaacgcat	tgcgattaat	tttgatggcg	tctatatgaa	tgcaacagtc	360
tggtttaatg	gcgttaaact	gggcacacat	ccgtatggct	attcaccggt	ttcatttgat	420
ctgacaggca	atgcaaaatt	tggcggagaa	aacacaattg	tcgtcaaagt	tgaaaataga	480
ctgccgtcat	caagatggta	ttcaggcagc	ggcattttata	gagatgttac	actgacagtt	540
acagatggcg	ttcatgttgg	caataatggc	gtcgcaatta	aaacaccgtc	actggcaaca	600
caaaatggcg	gagatgtcac	aatgaacctg	acaacaaaag	tcgcgaatga	tacagaagca	660
gcagcgaaca	ttacactgaa	acagacagtt	tttccgaaag	gcggaaaaac	ggatgcagca	720
attggcacag	ttacaacagc	atcaaaatca	attgcagcag	gcgcatcagc	agatgttaca	780
agcacaatta	cagcagcaag	cccgaactg	tggtcaatta	aaaacccgaa	cctgtataca	840
gttagaacag	aagttctgaa	cggaggcaaa	gttctggata	catatgatac	agaatatggc	900
tttgcgtgga	caggctttga	tgcaacatca	ggcttttcac	tgaatggcga	aaaagtcaaa	960
ctgaaaggcg	ttagcatgca	tcatgatcaa	ggctcacttg	gcgcagttgc	aaatagacgc	1020
gcaattgaaa	gacaagtcga	aatcctgcaa	aaaatgggcg	tcaatagcat	tcgcacaaca	1080
cataatccgg	cagcaaaagc	actgattgat	gtctgcaatg	aaaaaggcgt	tctggttgtc	1140
gaagaagtct	ttgatatgtg	gaaccgcagc	aaaaatggca	acacggaaga	ttatggcaaa	1200
tggtttggcc	aagcaattgc	aggcgataat	gcagttctgg	gaggcgataa	agatgaaaca	1260
tgggcgaaat	ttgatcttac	atcaacaatt	aaccgcgata	gaaatgcacc	gtcagttatt	1320
atgtggtcac	tgggcaatga	aatgatggaa	ggcatttcag	gctcagtttc	aggctttccg	1380
gcaacatcag	caaaactggt	tgcatggaca	aaagcagcag	attcaacaag	accgatgaca	1440
tatggcgata	acaaaattaa	agcgaactgg	aacgaatcaa	atacaatggg	cgataatctg	1500
acagcaaatg	gcggagttgt	tggcacaaat	tattcagatg	gcgcaaaacta	tgataaaatt	1560
cgtacaacac	atccgtcatg	ggcaatttat	ggctcagaaa	cagcatcagc	gattaatagc	1620
cgtggcattt	ataatagaac	aacaggcgga	gcacaatcat	cagataaaca	gctgacaagc	1680
tatgataaatt	cagcagttgg	ctggggagca	gttgcatcat	cagcatggta	tgatgttggt	1740
cagagagatt	ttgtcgcagg	cacatatggt	tggacaggat	ttgattatct	gggcgaaccg	1800

ES 2 650 444 T3

acaccgtgga atggcacagg ctccaggcgca gttggctcat ggccgtcacc gaaaaatagc 1860
tatttttgga tcgttgatac agcaggcttt ccgaaagata catattattt ttatcagagc 1920
cagtggaaatg atgatgttca tacactgcat attcttccgg catggaatga aaatgttggt 1980
gcaaaaggct caggcaataa tggtccgggt gtcgtttata cagatgcagc gaaagtgaaa 2040
ctgtatttta caccgaaagg ctcaacagaa aaaagactga tcggcgaaaa atcatttaca 2100
aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160
acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220
gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgccctg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280
tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340
acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg tcacagatgc aaatggccat 2400
attgttccgg atgcagcaaa tagagtcaca tttgatgtta aaggcgcagg caaactgggt 2460
ggcgttgata atggctcatc accggatcat gattcatatc aaggcgataa ccgcaaagca 2520
ttttcaggca aagtcctggc aattgttcag tcaacaaaag aagcaggcga aattacagtt 2580
acagcaaaaag cagatggcct gcaatcaagc acagttaaaa ttgcaacaac agcagttccg 2640
ggaacaagca cagaaaaaac agtccgcagc ttttattaca gccgcaacta ttatgtcaaa 2700
acaggcaaca aaccgattct gccgtcagat gttgaagttc gctattcaga tggaacaagc 2760
gatagacaaa acgttacatg ggatgcagtt tcagatgatc aaattgcaaa agcaggctca 2820
ttttcagttg caggcacagt tgcaggccaa aaaattagcg ttccggtcac aatgattgat 2880
gaaattggcg cactgctgaa ttattcagca agcacaccgg ttggcacacc ggcagttcct 2940
ccgggatcaa gaccggcagt cctgccggat ggcacagtca catcagcaaa ttttgcagtc 3000
cattggacaa aaccggcaga tacagtctat aatacagcag gcacagtcaa agtaccggga 3060
acagcaacag tttttggcaa agaattttaa gtcacagcga caattagagt tcaaagaagc 3120
caagttacaa ttggctcatc agtttcagga aatgactga gactgacaca aaatattccg 3180
gcagataaac aatcagatac actggatgcg attaaagatg gctcaacaac agttgatgca 3240
aatacaggcg gaggcgcaaa tccgtcagca tggacaaatt gggcatattc aaaagcaggc 3300
cataacacag cggaattac atttgaatat gcgacagaac aacaactggg ccagatcgtc 3360
atgtattttt ttccgcatag caatgcagtt agatttccgg atgctggcaa aacaaaaatt 3420
cagatcagcg cagatggcaa aaattggaca gatctggcag caacagaaac aattgcagcg 3480
caagaatcaa gcgatagagt caaacgtat acatatgatt ttgcaccggg tggcgcaaca 3540
tttgttaaag tgacagtcac aaacgcagat acaacaacac cgtcaggcgt tgtttgcgca 3600
ggcctgacag aaattgaact gaaaacagcg aca 3633

<210> 14
<211> 3888
<212> ADN
<213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..3888
 <223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

5 <400> 14

gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttggt	60
tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa	120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacia gatccggcat ttgatgattc agcatggcaa	180
caagttgatc tgccgatga ttatagcatc acacagaaat atagccaaag caatgaagca	240
gaatcagcat atcttccggg aggcacaggc tggatataga aaagctttac aattgataga	300
gatctggcag gcaaacgcat tgcgattaat ttgatggcg tctatatgaa tgcaacagtc	360
tggtttaatg gcgttaaact gggcacacat ccgatggct attcaccgtt ttcatttgat	420
ctgacaggca atgcaaaatt tggcggagaa aacacaattg tcgtcaaagt tgaaaataga	480
ctgccgtcat caagatggta ttcaggcagc ggcatttata gagatgttac actgacagtt	540
acagatggcg ttcatgttgg caataatggc gtcgcaatta aaacaccgtc actggcaaca	600
caaaatggcg gagatgtcac aatgaacctg acaacaaaag tcgcgaatga tacagaagca	660
gcagcgaaca ttacactgaa acagacagtt tttccgaaag gcggaaaaac ggatgcagca	720
attggcacag ttacaacagc atcaaaatca attgcagcag gcgcatcagc agatgttaca	780
agcacaatta cagcagcaag cccgaaactg tggtaatta aaaacccgaa cctgtataca	840
gttagaacag aagttctgaa cggaggcaaa gttctggata catatgatac agaatatggc	900
tttcgctgga caggctttga tgcaacatca ggcttttcac tgaatggcga aaaagtcaaa	960
ctgaaaggcg ttagcatgca tcatgatcaa ggctcacttg gcgcagttgc aaatagacgc	1020
gcaattgaaa gacaagtcga aatcctgcaa aaaatggcg tcaatagcat tcgcacaaca	1080
cataatccgg cagcaaaagc actgattgat gtctgcaatg aaaaaggcgt tctggttgct	1140
gaagaagtct ttgatatgtg gaaccgcagc aaaaatggca acacggaaga ttatggcaaa	1200
tggtttgcc aagcaattgc aggcgataat gcagttctgg gaggcgataa agatgaaaca	1260
tgggcgaaat ttgatcttac atcaacaatt aaccgcgata gaaatgcacc gtcagttatt	1320
atgtggtcac tgggcaatga aatgatggaa ggcatttcag gctcagtttc aggccttccg	1380
gcaacatcag caaaactggt tgcatggaca aaagcagcag attcaacaag accgatgaca	1440
tatggcgata acaaaattaa agcgaactgg aacgaatcaa atacaatggg cgataatctg	1500
acagcaaatg gcggagttgt tggcaciaat tattcagatg gcgcaacta tgataaaatt	1560

ES 2 650 444 T3

cgtacaacac	atccgtcatg	ggcaatztat	ggctcagaaa	cagcatcagc	gattaatagc	1620
cgtggcattt	ataatagaac	aacaggcgga	gcacaatcat	cagataaaca	gctgacaagc	1680
tatgataatt	cagcagttgg	ctggggagca	gttgcatcat	cagcatggta	tgatgttggt	1740
cagagagatt	ttgtcgcagg	cacatatggt	tggacaggat	ttgattatct	gggcgaaccg	1800
acaccgtgga	atggcacagg	ctcaggcgca	gttggctcat	ggccgtcacc	gaaaaatagc	1860
tattttggca	tcgttgatac	agcaggcttt	ccgaaagata	catattatct	ttatcagagc	1920
cagtggaaatg	atgatgttca	tacactgcat	attcttccgg	catggaatga	aaatgttggt	1980
gcaaaaggct	caggcaataa	tggtccgggt	gtcgtttata	cagatgcagc	gaaagtgaac	2040
ctgtatttta	caccgaaagg	ctcaacagaa	aaaagactga	tcggcgaaaa	atcattttaca	2100
aaaaaaacaa	cagcggcagg	ctatacatat	caagtctatg	aaggcagcga	taaagattca	2160
acagcgcata	aaaacatgta	tctgacatgg	aatgttccgt	gggcagaagg	cacaatttca	2220
gcggaagcgt	atgatgaaaa	taatcgccctg	attccggaag	gcagcacaga	aggcaacgca	2280
tcagttacaa	caacaggcaa	agcagcaaaa	ctgaaagcag	atgcggatcg	caaaacaatt	2340
acagcggatg	gcaaagatct	gtcatatatt	gaagtcgatg	tcacagatgc	aaatggccat	2400
attgttccgg	atgcagcaaa	tagagtcaca	tttgatgtta	aaggcgcagg	caaactgggt	2460
ggcgttgata	atggctcatc	accggatcat	gattcatatc	aagcggataa	ccgcaaagca	2520
ttttcaggca	aagtcttggc	aattgttcag	tcaacaaaag	aagcaggcga	aattacagtt	2580
acagcaaaaag	cagatggcct	gcaatcaagc	acagttaaaa	ttgcaacaac	agcagttccg	2640
ggaacaagca	cagaaaaaac	agtccgcagc	ttttattaca	gccgcaacta	ttatgtcaaa	2700
acaggcaaca	aaccgattct	gccgtcagat	gttgaagttc	gctattcaga	tggaacaagc	2760
gatagacaaa	acgttacatg	ggatgcagtt	tcagatgatc	aaattgcaaa	agcaggctca	2820
ttttcagttg	caggcacagt	tgcaaggcaa	aaaattagcg	ttcgcgtcac	aatgattgat	2880
gaaattggcg	cactgctgaa	ttattcagca	agcacaccgg	ttggcacacc	ggcagttctt	2940
ccgggatcaa	gaccggcagt	cctgccggat	ggcacagtca	catcagcaaa	ttttgcagtc	3000
cattggacaa	aaccggcaga	tacagtctat	aatacagcag	gcacagtcaa	agtaccggga	3060
acagcaacag	tttttggcaa	agaatttaaa	gtcacagcga	caattagagt	tcaaagaagc	3120
caagttacaa	ttggctcatc	agtttcagga	aatgcactga	gactgacaca	aaatattccg	3180
gcagataaac	aatcagatac	actggatgcg	attaaagatg	gctcaacaac	agttgatgca	3240
aatacaggcg	gaggcgcaaa	tccgtcagca	tggacaaaatt	gggcatattc	aaaagcaggc	3300
cataacacag	cggaatttac	atttgaatat	gcgacagaac	aacaactggg	ccagatcgtc	3360
atgtattttt	ttcgcgatag	caatgcagtt	agatttccgg	atgctggcaa	aacaaaaatt	3420

cagatcagcg cagatggcaa aaattggaca gatctggcag caacagaaac aattgcagcg 3480

caagaatcaa gcgatagagt caaaccgat acatatgatt ttgcaccggt tggcgcaaca 3540

tttgttaaag tgacagtcac aaacgcagat acaacaacac cgtcaggcgt tgtttgcgca 3600

ggcctgacag aaattgaact gaaaacagcg acaagcaaatt ttgtcacaaa tacatcagca 3660

gcactgtcat cacttacagt caatggcaca aaagtttcag attcagttct ggcagcaggc 3720

tcatataaca caccggcaat tatcgagat gttaaagcgg aaggcgaagg caatgcaagc 3780

gttacagtcc ttccggcaca tgataatgtt attcgcgtca ttacagaaag cgaagatcat 3840

gtcacacgca aaacatttac aatcaacctg ggcacagAAC aagaattt 3888

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
5 <213> Secuencias artificiales

<220>
<221> fuente
<222> 1..30
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="secuencias artificiales"

10 <400> 15

ggggaacta gtgaagatg caacaagaag 30

<210> 16
<211> 35
<212> ADN
15 <213> secuencias artificiales

<220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo de molécula ="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="secuencias artificiales"

20 <400> 16

gcgctaatt aattatgtt ttctgtgct tggc 35

<210> 17
<211> 38
<212> ADN
25 <213> secuencias artificiales

<220>
<221> fuente
<222> 1..38
<223> /tipo de moléculas ="ADN" /nota="Cebador de PCR sintético" /organismo="secuencias artificiales"

30 <400> 17

gcgctaatt aattacagt cgccaattc atcaatca 38

<210> 18
<211> 35
<212> ADN
35 <213> secuencias artificiales

<220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo de moléculas ="ADN" /nota="Cebador de PCR sintético" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 18
gcgcttaatt aattattgaa ctctaattgt cgctg 35
<210> 19
<211> 36
5 <212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..36
10 <223> /tipo de moléculas ="ADN" /nota="Cebador de PCR sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 19
gcgcttaatt aattatgtcg ctgttttcag ttcaat 36
<210> 20
<211> 35
15 <212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..35
20 <223> /tipo de moléculas="ADN" /nota="Cebador de PCR sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 20
gcgcttaatt aattaaaatt ctgttctgt gccca 35
<210> 21
<211> 38
25 <212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..38
30 <223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de PCR sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 21
gcgcttaatt aattatctca gtctaatttc gcttgcgc 38
<210> 22
<211> 1720
35 <212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..1720
40 <223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<400> 22

ES 2 650 444 T3

Val	Glu	Asp	Ala	Thr	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Thr	Gln	Met	Ser	Ser	Thr	1	5	10	15
Pro	Glu	Val	Val	Tyr	Ser	Ser	Ala	Val	Asp	Ser	Lys	Gln	Asn	Arg	Thr	20	25	30	
Ser	Asp	Phe	Asp	Ala	Asn	Trp	Lys	Phe	Met	Leu	Ser	Asp	Ser	Val	Gln	35	40	45	
Ala	Gln	Asp	Pro	Ala	Phe	Asp	Asp	Ser	Ala	Trp	Gln	Gln	Val	Asp	Leu	50	55	60	
Pro	His	Asp	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gln	Lys	Tyr	Ser	Gln	Ser	Asn	Glu	Ala	65	70	75	80
Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Pro	Gly	Gly	Thr	Gly	Trp	Tyr	Arg	Lys	Ser	Phe	85	90	95	
Thr	Ile	Asp	Arg	Asp	Leu	Ala	Gly	Lys	Arg	Ile	Ala	Ile	Asn	Phe	Asp	100	105	110	
Gly	Val	Tyr	Met	Asn	Ala	Thr	Val	Trp	Phe	Asn	Gly	Val	Lys	Leu	Gly	115	120	125	
Thr	His	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Pro	Phe	Ser	Phe	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	130	135	140	
Ala	Lys	Phe	Gly	Gly	Glu	Asn	Thr	Ile	Val	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Arg	145	150	155	160
Leu	Pro	Ser	Ser	Arg	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Tyr	Arg	Asp	Val	165	170	175	
Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Gly	Val	His	Val	Gly	Asn	Asn	Gly	Val	Ala	180	185	190	
Ile	Lys	Thr	Pro	Ser	Leu	Ala	Thr	Gln	Asn	Gly	Gly	Asp	Val	Thr	Met	195	200	205	
Asn	Leu	Thr	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Asp	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn	Ile	210	215	220	
Thr	Leu	Lys	Gln	Thr	Val	Phe	Pro	Lys	Gly	Gly	Lys	Thr	Asp	Ala	Ala	225	230	235	240
Ile	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Ala	Ser	245	250	255	
Ala	Asp	Val	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	Ser	260	265	270	
Ile	Lys	Asn	Pro	Asn	Leu	Tyr	Thr	Val	Arg	Thr	Glu	Val	Leu	Asn	Gly	275	280	285	
Gly	Lys	Val	Leu	Asp	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Gly	Phe	Arg	Trp	Thr	290	295	300	
Gly	Phe	Asp	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Asn	Gly	Glu	Lys	Val	Lys	305	310	315	320
Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Met	His	His	Asp	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Ala	Val	325	330	335	
Ala	Asn	Arg	Arg	Ala	Ile	Glu	Arg	Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Met	340	345	350	
Gly	Val	Asn	Ser	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Asn	Pro	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	355	360	365	
Ile	Asp	Val	Cys	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Val	Phe	370	375	380	

Asp	Met	Trp	Asn	Arg	Ser	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Glu	Asp	Tyr	Gly	Lys
385					390				395						400
Trp	Phe	Gly	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Asp
			405					410						415	
Lys	Asp	Glu	Thr	Trp	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Asn	Arg
			420					425					430		
Asp	Arg	Asn	Ala	Pro	Ser	Val	Ile	Met	Trp	Ser	Leu	Gly	Asn	Glu	Met
		435					440					445			
Met	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Phe	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala
	450					455				460					
Lys	Leu	Val	Ala	Trp	Thr	Lys	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Met	Thr
465					470				475						480
Tyr	Gly	Asp	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asn	Trp	Asn	Glu	Ser	Asn	Thr	Met
			485						490					495	
Gly	Asp	Asn	Leu	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	Val	Val	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ser
			500					505					510		
Asp	Gly	Ala	Asn	Tyr	Asp	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	His	Pro	Ser	Trp	Ala
		515					520					525			
Ile	Tyr	Gly	Ser	Glu	Thr	Ala	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Arg	Gly	Ile	Tyr
	530					535					540				
Asn	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gln	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Leu	Thr	Ser
545					550					555					560
Tyr	Asp	Asn	Ser	Ala	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Ala	Trp
			565						570					575	
Tyr	Asp	Val	Val	Gln	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Gly	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr
			580					585					590		
Gly	Phe	Asp	Tyr	Leu	Gly	Glu	Pro	Thr	Pro	Trp	Asn	Gly	Thr	Gly	Ser
		595					600					605			
Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Trp	Pro	Ser	Pro	Lys	Asn	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile
	610					615					620				
Val	Asp	Thr	Ala	Gly	Phe	Pro	Lys	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Ser
625					630					635					640
Gln	Trp	Asn	Asp	Asp	Val	His	Thr	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Ala	Trp	Asn
			645						650					655	
Glu	Asn	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Asn	Val	Pro	Val	Val	Val
			660						665				670		
Tyr	Thr	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Gly	Ser
		675					680					685			
Thr	Glu	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Phe	Thr	Lys	Lys	Thr	Thr
					695						700				
Ala	Ala	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Asp	Ser
705					710					715					720
Thr	Ala	His	Lys	Asn	Met	Tyr	Leu	Thr	Trp	Asn	Val	Pro	Trp	Ala	Glu
			725						730					735	
Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Glu	Ala	Tyr	Asp	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ile	Pro
			740						745				750		
Glu	Gly	Ser	Thr	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Ala
			755				760					765			
Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Arg	Lys	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Gly
	770					775					780				
Lys	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ile	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly	His
785					790					795					800
Ile	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Thr	Phe	Asp	Val	Lys	Gly	Ala
			805							810				815	
Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Ser	Pro	Asp	His	Asp	Ser
			820					825					830		
Tyr	Gln	Ala	Asp	Asn	Arg	Lys	Ala	Phe	Ser	Gly	Lys	Val	Leu	Ala	Ile
			835				840						845		
Val	Gln	Ser	Thr	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Lys	Ala
	850					855					860				
Asp	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Thr	Val	Lys	Ile	Ala	Thr	Thr	Ala	Val	Pro
865					870					875					880
Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Lys	Thr	Val	Arg	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Ser	Arg	Asn

														885								890								895			
Tyr	Tyr	Val	Lys	Thr	Gly	Asn	Lys	Pro	Ile	Leu	Pro	Ser	Asp	Val	Glu																		
														900				905				910											
Val	Arg	Tyr	Ser	Asp	Gly	Thr	Ser	Asp	Arg	Gln	Asn	Val	Thr	Trp	Asp																		
														915				920				925											
Ala	Val	Ser	Asp	Asp	Gln	Ile	Ala	Lys	Ala	Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Ala																		
														930				935				940											
Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Gln	Lys	Ile	Ser	Val	Arg	Val	Thr	Met	Ile	Asp																		
														945				950				955				960							
Glu	Ile	Gly	Ala	Leu	Leu	Asn	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	Pro	Val	Gly	Thr																		
														965				970				975											
Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Asp	Gly	Thr																		
														980				985				990											
Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Phe	Ala	Val	His	Trp	Thr	Lys	Pro	Ala	Asp	Thr																		
														995				1000				1005											
Val	Tyr	Asn	Thr	Ala	Gly	Thr	Val	Lys	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Thr	Val																		
														1010				1015				1020											
Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Ile	Arg	Val	Gln	Arg	Ser																		
														1025				1030				1035				1040							
Gln	Val	Thr	Ile	Gly	Ser	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Ala	Leu	Arg	Leu	Thr																		
														1045				1050				1055											
Gln	Asn	Ile	Pro	Ala	Asp	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	Leu	Asp	Ala	Ile	Lys																		
														1060				1065				1070											
Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Ala	Asn	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Asn	Pro																		
														1075				1080				1085											
Ser	Ala	Trp	Thr	Asn	Trp	Ala	Tyr	Ser	Lys	Ala	Gly	His	Asn	Thr	Ala																		
														1090				1095				1100											
Glu	Ile	Thr	Phe	Glu	Tyr	Ala	Thr	Glu	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Ile	Val																		
														1105				1110				1115				1120							
Met	Tyr	Phe	Phe	Arg	Asp	Ser	Asn	Ala	Val	Arg	Phe	Pro	Asp	Ala	Gly																		
														1125				1130				1135											
Lys	Thr	Lys	Ile	Gln	Ile	Ser	Ala	Asp	Gly	Lys	Asn	Trp	Thr	Asp	Leu																		
														1140				1145				1150											
Ala	Ala	Thr	Glu	Thr	Ile	Ala	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Asp	Arg	Val	Lys																		
														1155				1160				1165											
Pro	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Phe	Ala	Pro	Val	Gly	Ala	Thr	Phe	Val	Lys	Val																		
														1170				1175				1180											
Thr	Val	Thr	Asn	Ala	Asp	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Gly	Val	Val	Cys	Ala																		
														1185				1190				1195				1200							
Gly	Leu	Thr	Glu	Ile	Glu	Leu	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	Lys	Phe	Val	Thr																		
														1205				1210				1215											
Asn	Thr	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Val																		
														1220				1225				1230											
Ser	Asp	Ser	Val	Leu	Ala	Ala	Gly	Ser	Tyr	Asn	Thr	Pro	Ala	Ile	Ile																		
														1235				1240				1245											
Ala	Asp	Val	Lys	Ala	Glu	Gly	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Val	Leu																		
														1250				1255				1260											
Pro	Ala	His	Asp	Asn	Val	Ile	Arg	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Glu	Asp	His																		
														1265				1270				1275				1280							
Val																																	

```

Thr Asn Trp Thr Asp Ala Gly Ser Gly Thr Trp Thr Thr Asp Tyr Gly
1395 1400 1405
Trp Lys Leu Ala Glu Phe Asn Gln Pro Val Thr Thr Lys His Val Arg
1410 1415 1420
Leu Lys Ala Val His Thr Tyr Ala Asp Ser Gly Asn Asp Lys Phe Met
1425 1430 1435 1440
Ser Ala Ser Glu Ile Arg Leu Arg Lys Ala Val Asp Thr Thr Asp Ile
1445 1450 1455
Ser Gly Ala Thr Val Thr Val Pro Ala Lys Leu Thr Val Asp Arg Val
1460 1465 1470
Asp Ala Asp His Pro Ala Thr Phe Ala Thr Lys Asp Val Thr Val Thr
1475 1480 1485
Leu Gly Asp Ala Thr Leu Arg Tyr Gly Val Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr
1490 1495 1500
Ala Gly Asn Thr Ala Val Gly Lys Ala Thr Val Thr Val Arg Gly Ile
1505 1510 1515 1520
Asp Lys Tyr Ser Gly Thr Val Ala Lys Thr Phe Thr Ile Glu Leu Lys
1525 1530 1535
Asn Ala Pro Ala Pro Glu Pro Thr Leu Thr Ser Val Ser Val Lys Thr
1540 1545 1550
Lys Pro Ser Lys Leu Thr Tyr Val Val Gly Asp Ala Phe Asp Pro Ala
1555 1560 1565
Gly Leu Val Leu Gln His Asp Arg Gln Ala Asp Arg Pro Pro Gln Pro
1570 1575 1580
Leu Val Gly Glu Gln Ala Asp Glu Arg Gly Leu Thr Cys Gly Thr Arg
1585 1590 1595 1600
Cys Asp Arg Val Glu Gln Leu Arg Lys His Glu Asn Arg Glu Ala His
1605 1610 1615
Arg Thr Gly Leu Asp His Leu Glu Phe Val Gly Ala Ala Asp Gly Ala
1620 1625 1630
Val Gly Glu Gln Ala Thr Phe Lys Val His Val His Ala Asp Gln Gly
1635 1640 1645
Asp Gly Arg His Asp Asp Ala Asp Glu Arg Asp Ile Asp Pro His Val
1650 1655 1660
Pro Val Asp His Ala Val Gly Glu Leu Ala Arg Ala Ala Cys His His
1665 1670 1675 1680
Val Ile Gly Leu Arg Val Asp Thr His Arg Leu Lys Ala Ser Gly Phe
1685 1690 1695
Gln Ile Pro Ala Asp Asp Met Ala Glu Ile Asp Arg Ile Thr Gly Phe
1700 1705 1710
His Arg Phe Glu Arg His Val Gly
1715 1720

```

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..30

10 <223> /tipo de molécula="proteína" /nota="Secuencia señal de lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

<400> 23

```

Val Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15
Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala
20 25 30

```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionado del grupo constituido por:
 - a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácidos y
 - 5 b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 975 restos de aminoácidos.
2. El polipéptido según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 1, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácido.
- 10 3. El polipéptido según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID n°: 2, en donde dicho polipéptido consta como máximo de 975 restos de aminoácidos.
4. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 1 o la SEQ ID n°: 2.
- 15 5. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polipéptido tiene una relación de actividad de transgalactosilación superior al 100%.
6. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
7. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 6, o que expresa un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 20 8. Una célula capaz de expresar un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Un método para expresar un polipéptido, comprendiendo el método la obtención de una célula según la reivindicación 8 y expresando el polipéptido en la célula, y opcionalmente purificando el polipéptido.
10. Una composición que comprende un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
11. Una composición según la reivindicación 10, en la que la composición es una composición alimenticia.
- 25 12. La composición según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la composición es un producto lácteo.
13. Un método para producir un producto alimenticio mediante tratamiento de un sustrato lácteo que comprende lactosa con un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el sustrato lácteo es cualquier material de leche cruda y/o procesada.
14. El método según la reivindicación 13 para producir un producto lácteo tratando un sustrato lácteo que comprende lactosa con un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el sustrato lácteo es cualquier material de leche en bruto y/o procesada.
- 30 15. Un procedimiento para producir galactooligosacáridos, que comprende poner en contacto un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una célula de la reivindicación 8 con una solución láctea que comprende lactosa.

Figura 1

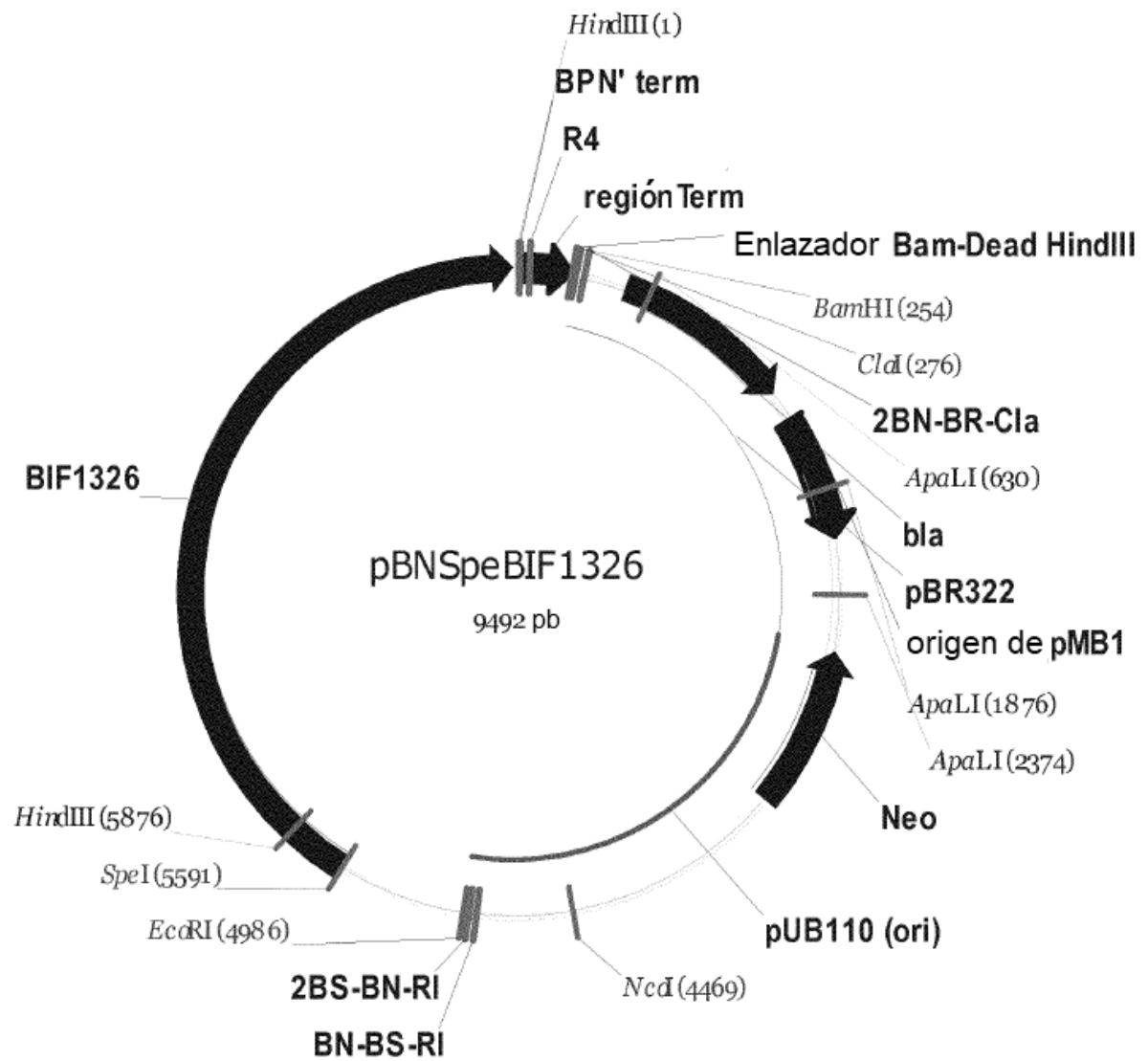


Figura 2

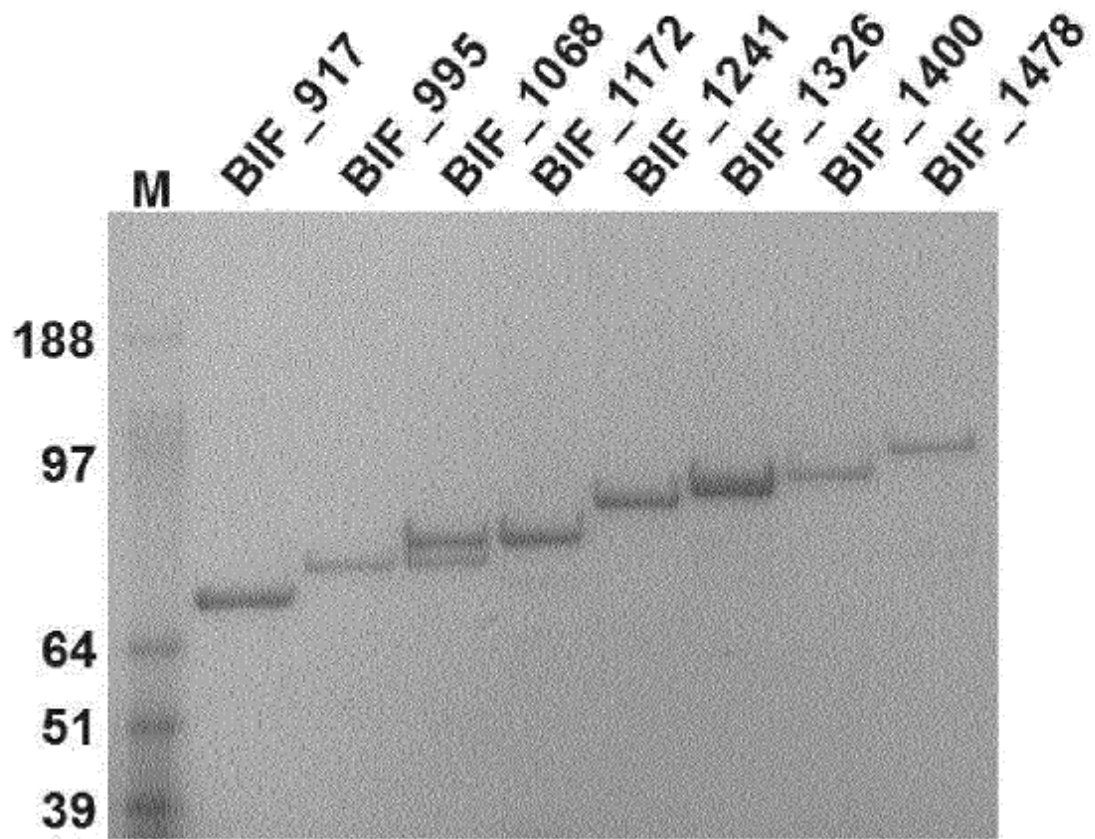


Figura 3

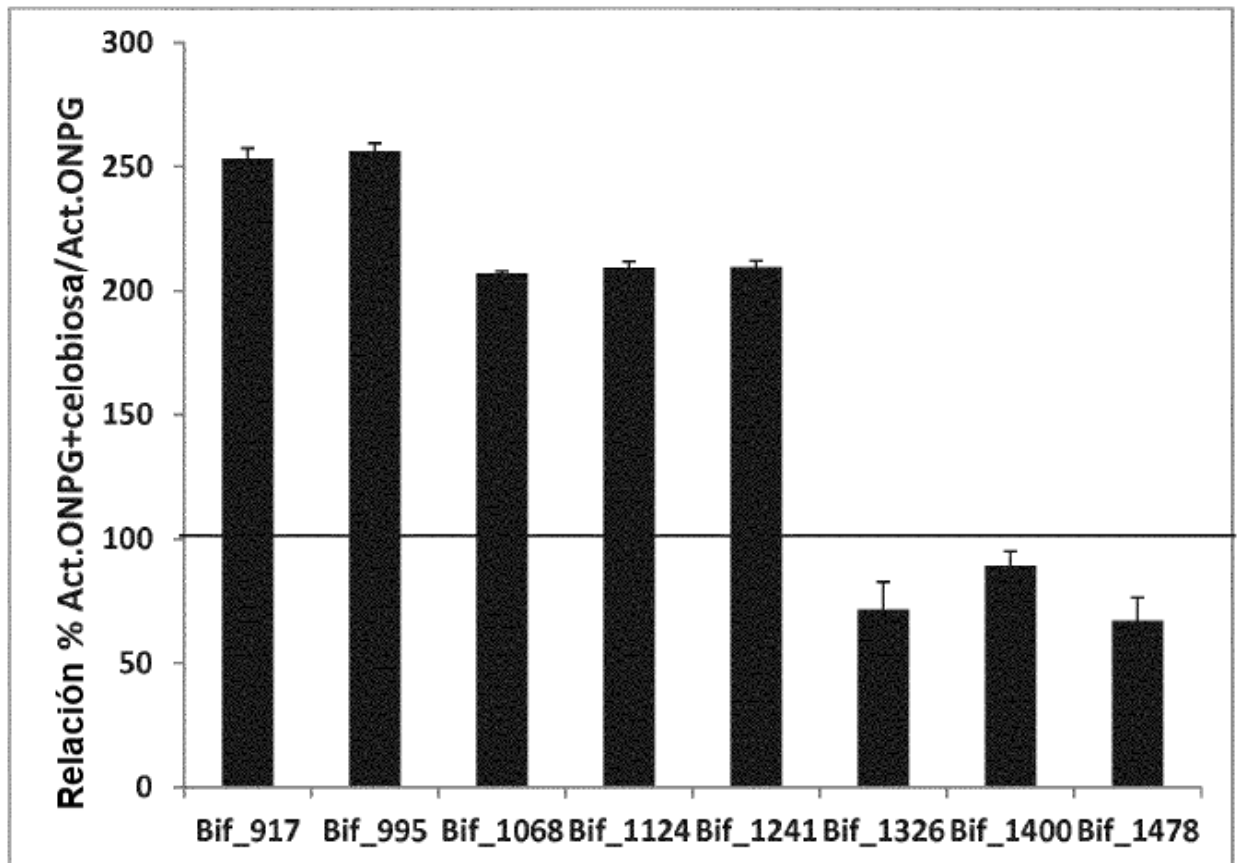


Figura 4

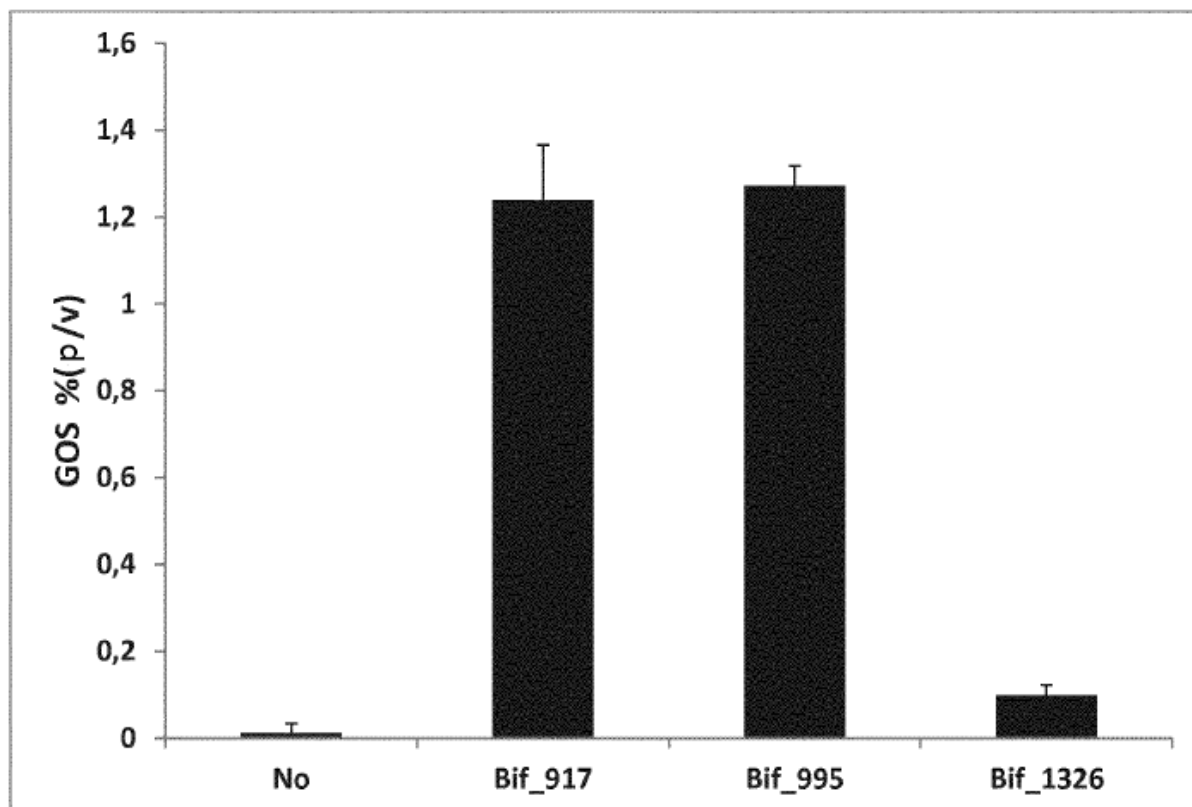


Figura 5

