



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 767**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02735085 .9**

96 Fecha de presentación : **18.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1383874**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

54

Título: **Variantes de lipoxigenasa y su uso.**

30

Prioridad: **20.04.2001 DK 2001 00631**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2010

73

Titular/es: **Novozymes A/S**
Krogshovej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72

Inventor/es: **Sugio, Akiko y**
Takagi, Shinobu

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 338 767 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).

ES 2 338 767 T3

DESCRIPCIÓN

Variantes de lipoxigenasa y su uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una lipoxigenasa y a un polinucleótido que la codifica.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La lipoxigenasa (EC 1.13.11.12) es una enzima que cataliza la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido linoleico, ácido linolénico y ácido araquidónico, que contiene una unidad cis,cis-1,4-pentadieno y produce hidroperóxidos de estos ácidos grasos. La enzima es distribuida en gran parte en plantas y animales. Un número de genes de la lipoxigenasa han sido aislados a partir de varias fuentes vegetales y mamíferas.

20 Por otra parte, sólo un número limitado de lipoxigenasas microbianas son conocidas, y ningún gen de lipoxigenasa de origen microbiano ha sido descrito. Su and Oliw, J. Biological Chemistry, 273 (21), 13072-79 (1998) describen una lipoxigenasa de *Gaeumannomyces graminis*.

20 **Resumen de la invención**

25 Los inventores han descubierto una nueva lipoxigenasa fúngica y han determinado su secuencia, la cual puede ser usada para la producción de la enzima a escala industrial. Estos han clonado el gen en *E. coli* y depositado el clon.

Por consiguiente, la invención provee una lipoxigenasa que es:

- 30 a) un polipéptido codificado por una secuencia de ADN clonada en el plásmido pUC19 presente en *Escherichia coli* depositado como DSM 14139,
- b) un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos como el péptido maduro expuesto en la SEC ID N: 1,
- 35 c) un análogo del polipéptido definido en (a) o (b) que:
- i) tiene al menos 85% de homología con dicho polipéptido,
 - ii) es una variante alélica de dicho polipéptido, o
- 40 d) un polipéptido codificado por ADN que se hibridiza en condiciones de astringencia alta con una cadena complementaria de
- 45 i) la secuencia de ADN clonada en un plásmido pUC19 presente en *Escherichia coli* depositado como DSM 14139 o
 - ii) la secuencia de ADN de SEC ID N: 1 de codificación del polipéptido maduro.

50 La invención provee también un polinucleótido que comprende:

- a) la secuencia de ADN parcial codificante de una lipoxigenasa madura clonada en un plásmido presente en *Escherichia coli* DSM 14139,
- 55 b) la secuencia de ADN parcial codificante de una lipoxigenasa madura mostrada en la SEC ID N: 1,
- c) un análogo de la secuencia definida en a) o b) que codifica una lipoxigenasa y
 - 60 i) que tiene al menos 85% de homología con dicha secuencia de ADN, o
 - ii) se hibridiza en astringencia alta con una cadena complementaria de dicha secuencia de ADN,
 - iii) es una variante alélica de la misma, o
- 65 d) una cadena complementaria de a), b) o c).

Otros aspectos de la invención proveen un constructo de ácido nucléico y un vector de expresión recombinante comprendiendo el polinucleótido, una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo o el vector, y un método para producir una lipoxigenasa mediante el cultivo de la célula. Además, la invención provee un método de selección de una librería eucariótica para obtener una lipoxigenasa y una sonda de oligonucleótidos útil para la selección. Finalmente, la invención provee el uso de la lipoxigenasa en productos de cocción y en un detergente.

Descripción detallada de la invención

10 Fuente de ADN genómico

Un gen de lipoxigenasa de la invención puede ser derivado de un hongo filamentoso, por ejemplo un Ascomi-
cota, particularmente Magnaporthaceae, tal como una cepa de *Magnaporthe salvinii*
Cattaneo (*Mycologia* 64 (1),110 (1972)). La especie es también conocida con los sinónimos *Curvularia sigmoidea*,
15 *Helminthosporium sigmoideum*, *Leptosphaeria salvinii*, *Nakataea sigmoidea*, *Sclerotium oryzae* y *Vakrabeja sigmoi-*
dea. Un ejemplo es la cepa *M. salvinii* IFO 6642.

De forma alternativa, el gen puede ser aislado a partir de *Pyricularia*, por ejemplo *P. oryzae* o *P. grisea*, por ejemplo
P. oryzae IFO 30517. Las cepas IFO son distribuidas comercialmente por el Institute for Fermentation, Osaka (IFO),
20 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón.

El gen de lipoxigenasa puede ser aislado a partir de estos organismos usando unas sondas diseñadas en base a las
secuencias de ADN en esta especificación.

Una cepa de *Escherichia coli* conteniendo un gen de lipoxigenasa a partir de *M. salvinii* IFO 6642 fue depositada
por los inventores según las condiciones del Tratado de Budapest con Deutsche Sammlung von Microorganismen
und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig DE, Alemania. La fecha de depósito fue el
25 28 de febrero de 2001, y el número de acceso era DSM 14139.

30 Producción de lipoxigenasa por cultivo de transformante

La lipoxigenasa de la invención puede ser producida por transformación de una célula huésped adecuada con una
secuencia de ADN codificante de la lipoxigenasa, cultivo del organismo transformado en condiciones que permiten la
35 producción de la enzima, y por recuperación de la enzima del cultivo.

El organismo huésped puede ser una célula eucariótica, en particular una célula fúngica, tal como una célula de
levadura o una célula fúngica filamentosa, por ejemplo una cepa de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* o *saccharomy-*
ces, particularmente *A. Niger*, *A. oryzae*, *F. graminearum*, *F. samb?cinum*, *F. cerealis* o *S. cerevisiae*. La producción de
40 la lipoxigenasa en estos organismos huéspedes puede ser realizada por los métodos generales descritos en EP 238,023
(Novo Nordisk), WO 96/00787 (Novo Nordisk) o EP 244,234 (Alko).

45 Propiedades de LOX

La lipoxigenasa de la invención es capaz de oxidar una gama amplia de sustratos que contienen una fracción cis-cis-
pentadienilo. De esta manera, actúa sobre los ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido linoleico (18 átomos
de carbono, 2 enlaces dobles), ácido linoléico (18:3), ácido araquidónico (20:4), ácido eicosapentanoico (AEP, 20:5)
y ácido docosahexaenoico (ADH, 22:6). También actúa sobre ácidos grasos otros que los sustratos, tales como el
50 linoleato de metilo y probablemente también triglicéridos. La enzima presenta una constante de Michaelis muy baja
(K_M) con respecto al ácido linoleico y una alta especificidad (V_{max}/K_M) hacia este sustrato.

La lipoxigenasa de *M. salvinii* es una 9-lipoxigenasa, es decir que oxida el enlace doble entre los átomos de carbono
9 y 10 en ácido linoleico y ácido linoléico.

La lipoxigenasa de *M. salvinii* presenta una actividad óptima alrededor de pH7, y es altamente activa por encima de
una gama de pH amplia de 3-12, con más de 50% de actividad óptima en la gama de pH 6-11. Esta es estable después
de toda una noche de incubación en pH 5-11.

La lipoxigenasa nativa de *M. salvinii* presenta una actividad óptima a 50-60°C. Es bastante activa a 40-60°C, y la
actividad empieza a descender a 70°C. La lipoxigenasa es estable después de 30 minutos de incubación con un pH 7 a
temperaturas hasta 50°C.

La velocidad de reacción para la lipoxigenasa recombinante (expresada en *A. oryzae*) aumenta casi diez veces a la
temperatura óptima para una catálisis en comparación con el nivel obtenido a temperatura ambiente. La velocidad de
65 reacción máxima es obtenida a 67.5°C. Una reducción excesiva de la constante de nivel es detectada por encima de la
temperatura óptima. Se cree que la glicosilación vuelve la enzima recombinante más estable con respecto al calor que
la enzima de tipo salvaje.

ES 2 338 767 T3

La lipoxigenasa recombinante es bastante estable a temperaturas hasta 50°C durante al menos una hora. La actividad cae en una forma lineal a temperaturas superiores entre 50-60°C, y ninguna actividad es detectada después de incubaciones superiores a 60°C durante una hora. Ninguna pérdida de actividad es detectada durante la incubación a temperaturas inferiores a 45°C.

5

Soluciones congeladas de lipoxigenasa pierden un poco de actividad durante el almacenamiento. Con la adición de 10% de glicerol no hay ninguna pérdida de actividad perceptible después de dos semanas de almacenamiento a -20°C, y los enzimas sobreviven a ciclos repetidos de descongelación-congelación sin pérdida de actividad.

10 La lipoxigenasa de la invención tiene una buena estabilidad en presencia de agentes tensioactivos aniónicos. Por consiguiente, la lipoxigenasa de *M. salvinii* es estable en presencia de 400 ppm de LAS (sulfonato de alquilbenceno lineal).

15 *Uso de lipoxigenasa*

La lipoxigenasa puede ser usada para una síntesis de aromas de toque verde, por ejemplo nonenal a partir de 9-hidropéroxido de ácido linoléico. La síntesis puede ser realizada en analogía con Whitehead *et al.* 1995, Cereal foods world 40(4), 193-197 y la patente estadounidense 4769243.

20

La lipoxigenasa también puede ser usada para la síntesis de hormonas vegetales tal como se describe en JP H11-29410.

25 Además la lipoxigenasa es un buen oxidante de carotenoides, por lo que puede ser usada para el blanqueo de productos alimentarios como la harina, aceite o alimentos marinos incluyendo carotenoides o pigmentos de tipo carotenoides.

30 La actividad oxidante puede ser utilizada para una reticulación de proteína, aceite, almidón, fibra y mezcla de éstos. La reticulación de compuestos químicos puede ser utilizada para la síntesis de polímero para producir fibra plástica o resina plástica. Se puede usar para el blanqueo en forma de detergente para manchas fenólicas, carotenoides o de grasa o la decoloración. O puede ser usada para el blanqueo de aguas residuales o de colorante textil.

35 La lipoxigenasa puede ser usada para el blanqueo de materias vegetales o de alimentos marinos conteniendo carotenoides. Se podría usar así para el blanqueo de harina para el pan, fideos o pasta, o blanqueo de carne de pescado o de aceite de pescado conteniendo astaxantina.

40 También se puede usar para la reticulación de proteínas, aceite, almidón, fibra vegetal o mezcla de éstos en presencia de ácidos grasos, aceite o grasas. Es útil cambiar la textura o propiedades físicas de los productos alimentarios o controlar el aroma de grasas y aceites, o para producir polímeros hechos de materias naturales además de un uso alimentario. Los compuestos reticulados pueden ser compuestos químicos, por ejemplo, compuestos fenólicos, carbonilos, carboxilos o amidas o una mezcla de estos. Esta puede ser usada para la síntesis de fibra plástica o de resina.

45 Otros usos de lipoxigenasa pueden ser la síntesis de un compuesto aromático como el hexanal o hexenal junto, como efecto de sinergia de liasa de hidroperóxido. O en el caso en el que el material vegetal sea usado como la fuente de más de dos enzimas, la lipoxigenasa puede ser añadida a éste para mejorar el rendimiento del compuesto de sabor. Algo similar puede realizarse para la síntesis de hormonas vegetales o animales.

50 Finalmente ésta puede ser usada como blanqueador. Puede ser usada en detergentes para el lavado de manchas fenólicas, carotenoides, grasas o la decoloración de la ropa. O puede ser usada para el lavado de un colorante textil o colorante para la industria de pasta en aguas residuales o en el cambio de textura colorante.

Vector de expresión recombinante

55 El vector de expresión de la invención incluye típicamente secuencias de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión de ribosomas, una señal de inicio de translación, y opcionalmente, un marcador seleccionable, un terminador de transcripción, un gen represor o diferentes genes activadores. El vector puede ser un vector de replicación autónoma, o puede ser integrado en el genoma de la célula huésped.

60

Producción por cultivo de transformante

65 La lipoxigenasa de la invención puede ser producida por transformación de una célula huésped adecuada con una secuencia de ADN que codifica la lipoxigenasa, por cultivo del organismo transformado en condiciones que permiten la producción de la enzima, y por recuperación de la enzima del cultivo.

El organismo huésped puede ser una célula eucariótica, en particular una célula fúngica, tal como una célula de levadura o una célula fúngica filamentosa, por ejemplo una cepa de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* o *Saccha-*

ES 2 338 767 T3

romyces, particularmente *A. Niger*, *A. oryzae*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. cerealis* o *S. cerevisiae*. La producción de la lipoxigenasa en tales organismos huéspedes puede ser realizada según los métodos generales descritos en EP 238,023 (Novo Nordisk), WO 96/00787 (Novo Nordisk) o EP 244,234 (Alko).

5 La enzima puede ser purificada en una etapa por cromatografía de intercambio de cationes hasta la homogeneidad.

Hibridación

10 Se usa la hibridación para indicar que una secuencia de ADN provista es análoga a una sonda de nucleótidos correspondiente a una secuencia de ADN de la invención. La hibridación puede ser realizada en astringencia alta. Un ejemplo de las condiciones de hibridación está descrita más detalladamente a continuación.

15 Condiciones adecuadas para determinar la hibridación entre una sonda de nucleótidos y un ADN homólogo o secuencia de ARN, implica el preremolaje del filtro que contiene los fragmentos de ADN o el ARN en 5 X SSC (citato de solución salina estándar) durante 10 minutos, y la prehibridación del filtro en una solución de 5 x SSC (Sambrook *et al.* 1989), 5 x solución de Denhardt (Sambrook *et al.* 1989), 0.5% SDS y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón ultrasonificado desnaturalizado (Sambrook *et al.* 1989), seguido de una hibridación en la misma solución conteniendo una sonda de cebado aleatorio (Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132:6-13), ³²P-dCTP-mar-
20 cado (actividad específica > 1 X 10⁹ cpm/µg) durante 12 horas a aprox. 45°C. El filtro es lavado posteriormente dos veces durante 30 minutos en 2 X SSC, 0.5% SDS a una temperatura de al menos 55°C, particularmente al menos 60°C, más particularmente al menos 65°C, por ejemplo al menos 70°C, o al menos 75°C.

25 Unas moléculas con las que la sonda de oligonucleótidos se hibridiza en estas condiciones son detectadas usando una película de rayos x.

Alineación y homología

30 La lipoxigenasa y la secuencia de nucleótidos de la invención pueden tener homología con respecto a las secuencias descritas de al menos 85%, particularmente al menos 90% o al menos 95%, por ejemplo al menos 98%.

35 Para los objetivos de la presente invención, alineamientos de secuencias y cálculo de resultados de homología fueron realizados usando una alineación de Needleman-Wunsch (es decir, alineación global), útil para ambos alineamientos de proteínas y de ADN. Las matrices de resultados por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad son usadas para alineamientos de proteínas y de ADN respectivamente. La penalización para el primer residuo en un espacio es de -12 para las proteínas y de -16 para el ADN, mientras que la penalización para residuos adicionales en un espacio es de -2 para las proteínas y de -4 para el ADN. La alineación procede de la versión de paquete FASTA v20u6 (W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis" *PNAS* 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990), "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA" *Methods in Enzymology*, 183:63-98).

Ejemplos

45 *Materiales y métodos*

Unas técnicas de clonación molecular son descritas en Sambrook *et al.* (1989).

50 Los siguientes plásmidos comerciales y cepas de *E. coli* fueron usados para una subclonación y construcción de biblioteca de ADN:

pT7Blue (Novagen)

55 pUC19 (TOYOBO, Japón)

E. coli MI 09 (TOYOBO, Japón)

60 *E. coli* DH12S (GIBCO BRL, Life Technologies, EEUU)

El marcado y la detección de sonda de hibridación se realizaron usando un marcado DIG y un kit de detección (Boehringer Mannheim). Una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham, Inglaterra) fue usada para la transferencia de ADN para la hibridación de colonias.

65 La lipoxigenasa de soja (tipo I-B) (cat.# L7315) y astaxantina (cat.# A-9335) fue suministrada por Sigma. El beta-caroteno (cat.# 031-05533) fue suministrado por Wako.

ES 2 338 767 T3

Medios y solución de tampón

COVE-ar: por litro 342.3 g de sacarosa, 20 ml de solución salina COVE, 10 mM de acrilamida, 15 mM de CsCl₂, 30 g de agar noble (Difco)

COVE2-ar: por litro 30 g de sacarosa, 20 ml de solución salina COVE, 10 mM de acrilamida, 30 g de agar noble (Difco)

Solución salina COVE: por litro 26 g de KCl, 26 g de MgSO₄-7H₂O, 76 g KH₂PO₄, 50 ml de metales traza COVE.

Metales traza COVE: por litro 0.04 g de NaB₄O₇-10H₂O, 0.4 g de CuSO₄-5H₂O, 1.2 g de FeSO₄-7H₂O, 0.7 g de MnSO₄-H₂O, 0.7 g de Na₂MoO₂-2H₂O, 0.7 g ZnSO₄-7H₂O.

Metales traza AMG: por litro 14.3 g de ZnSO₄-7H₂O, 2.5 g de CuSO₄-5H₂O, 0.5 g de NiCl₂, 13.8 g de FeSO₄, 8.5 g de MnSO₄, 3.0 g de ácido cítrico.

YPG: por litro 4 g de extracto de levadura, 1 g de KH₂PO₄, 0.5 g de MgSO₄-7H₂O, 15 g de glucosa, pH 6.0.

STC: 0.8 M de sorbitol, 25 mM de tris pH 8, 25 mM de CaCl₂.

STPC: 40% de PEG4000 en tampón STC.

Agarosa superior COVE: por litro 342.3 g de sacarosa, 20 ml de solución salina COVE, 10 mM de acetamida, 10 g de agarosa de baja fusión.

MS-9: por litro 30 g de polvo de soja, 20 g de glicerol, pH 6.0.

MDU-2Bp: por litro 45 g de maltosa-1H₂O, 7 g de extracto de levadura, 12 g de KH₂PO₄, 1 g de MgSPO₄-7H₂O, 2 g de K₂SO₄, 5 g de urea, 1 g de NaCl, 0.5 ml de solución de metal traza AMG pH 5.0.

Organismo huésped

El *Aspergillus oryzae* BECh2 está descrito en WO 00/39322. Es un mutante de JaL228 (descrito en WO98/123000), el cual es un mutante de IF04177.

Transformación de *A. oryzae*

Una cepa de *Aspergillus oryzae* BECh2 fue inoculada en 100 ml de medio YPG e incubada a 32°C durante 16 horas con una agitación a 80 r.p.m. El micelio crecido fue recogido por filtración seguido de un lavado con 0.6 M de KCl y resuspendido en 30 ml de 0.6 M de KCl conteniendo Glucanex[®] (Novozymes) en la concentración de 30 µl/ml. La mezcla fue incubada a 32°C con la agitación a 60 r.p.m. hasta formar los protoplastos. Después de la filtración para eliminar el micelio mantenido, los protoplastos fueron recogidos por centrifugado y lavados dos veces con un tampón STC. Los protoplastos fueron contados con un hemacitometro y resuspendidos en una solución de STC:STPC:DMSO (8:2:0.1) en una concentración final de 1.2 X 10⁷ protoplasos/ml. Aproximadamente 4 µg de ADN fueron añadidos a 100 µl de solución de protoplastos, se mezclaron ligeramente y fueron incubados en hielo durante 30 minutos. 1 µl de tampón STPC fue añadido a la mezcla e incubado a 37°C durante otros 30 minutos. Después de la adición de 10 ml de agarosa superior Cove precalentados a 50°C, la mezcla de reacción fue vertida en placas de agar COVE-ar. Las placas fueron incubadas a 32°C durante 5 días.

SDS-PAGE

Una electroforesis en poliacrilamida SDS fue efectuada usando el gel comercializado PAGEL AE6000 NPU-7.5L (7.5T%) con el aparato AE-6400 (Atto, Japón) siguiendo el protocolo provisto. 15 µl de muestra fueron suspendidos en 15 µl de 2x concentrado de tampón de carga de muestra (100 mM tris-HCl (pH 6.8), 200 mM ditiotreitol, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol y 20% glicerol) y hervidos durante 5 minutos. 20 µl de solución de muestra fueron aplicados en un gel de poliacrilamida, y sometidos a una electroforesis en el tampón usado (25 mM Tris, 0.1% SDS, 192 mM glicina) a 20 mA por gel. El gel obtenido fue teñido con naranja SYPRO y detectado por Molecular Imager FX (BIO-RAD).

ES 2 338 767 T3

Ensayos para determinar la actividad de la lipoxigenasa

Ensayo espectrofotométrico

5 La actividad de lipoxigenasa fue determinada espectrofotométricamente a 25°C siguiendo la formación de hidroperóxidos con la absorbencia a 234 nm. En 0.98 ml del tampón (50 mM KH₂PO₄/NaHPO₄, pH 7.0), 10 µl de solución de sustrato (10 mM de ácido linolénico dispersos con 0.2% Tween 20) fueron añadidos y la reacción se inició mediante la adición de 10 µl de solución enzimática. Una unidad produce un aumento de la absorbencia a 234 nm de 0.001/min.

10

Ensayo FOX

El ensayo se inició mediante la adición de 20 µl de solución enzimática a 80 µl de 50 mM de cada tampón conteniendo 0.7 mM de ácido linolénico dispersos con 0.02% de Tween 20 usando Hiscotron, e incubados durante 10 min. El ensayo se terminó mediante la adición de 900 µl de reactivo FOX: ácido sulfúrico (25 mM), naranja de xilenol (100 µM), sulfato de hierro (II) (100 µM), hidroxitolueno butilado (4 mM) en metanol:agua (9:1). Unas muestras en blanco contenían sólo una solución de sustrato durante la incubación, pero una solución enzimática fue añadida después de la adición del reactivo FOX. El color amarillo de naranja de xilenol acidificado se convirtió en un color azul debido a la oxidación mediada por hidroperóxido de lípidos de iones Fe²⁺ con el colorante. La absorbencia del complejo Fe³⁺ a 620 nm fue medida 1 hora después de la adición de reactivo FOX.

20

Ensayo de blanqueo

25 El efecto blanqueador por lipoxigenasa fue examinado espectrofotométricamente a 25°C siguiendo la absorbencia a 470 nm. La solución de pigmento fue preparada de la siguiente manera. 150 µl de solución de pigmento de reserva a 470 nm. La solución de pigmento fue preparada de la siguiente manera. 150 µl de solución de pigmento de reserva (1 mg de cada pigmento en 1 ml de cloroformo) fueron evaporados para ser secados. Después 30 ml del tampón (50 mM KH₂PO₄/NaHPO₄, pH 7.0) fueron añadidos lentamente con 0.3% de Tween 20 y el pigmento fue disuelto. Se añadió 10 µl de solución de sustrato (10 mM ácido linolénico disperso con 0.2% de Tween 20) a 0.98 ml de solución de pigmento, y la reacción comenzó por la adición de 10 µl de solución enzimática.

30

Ejemplo 1

35 Clonación de gen LOX genómico de *M. salvinii*

El ADN genómico de *Magnaporthe salvinii* fue digerido con *SacI* y separado en 1.0% de gel de agarosa. Aproximadamente 2.5 kbp de digestión de ADN fueron recuperados a partir del gel y ligados con pUC19 tratado con BAP linealizado por *SacI*. Una mezcla de ligadura fue transformada en *E. coli* DH12S para construir una biblioteca genómica parcial. Esta fue seleccionada, y una colonia *E. coli* positiva de lipoxigenasa fue aislada y el plásmido, denominado pSG28, fue recuperado. El plásmido pSG28 contenía un fragmento genómico *SacI* de 2.5 kbp que contenía la presunta secuencia homologa LOX. La secuencia de 1973 pb externa a 2.5 kbp está mostrada como SEC. ID 1.

40

Unos intrones fueron identificados y están indicados en la SEC ID n°: 1. Los sitios de unión fueron previstos tal y como se describe en S.M. Hebsgaard *et al.*, Nucleic Acids Research, 1996, vol. 24, n° 17, 3439-3452.

45

El presunto marco de lectura abierto consistía en 1851 pb, y la secuencia de aminoácidos deducida correspondía a 617 aminoácidos, expuesta como SEC ID n°: 2. La masa molecular fue estimada a 67500 Da.

50 El *E. coli* DH12S conteniendo el plásmido pSG28 fue depositado en DSMZ como DSM 14139 con la fecha de acceso de 28-02-2001.

50

Ejemplo 2

55

Expresión de *M. salvinii* LOX en *A. oryzae*

Construcción de plásmido de expresión

60 La secuencia genómica parcial de gen genómico de *M. salvinii* fue amplificada por PCR mediante el uso de pSG28 en forma de patrón. Los cebadores 3 e 4 (SEC ID n°: 3 y 4) fueron diseñados para formar sitios *Bam*HI y *Xho*I en ambas extremidades del producto de PCR (nucleótidos 4-9 de cebador 3 y 5-10 de cebador 4, respectivamente). La mezcla de reacción de PCR comprendía 2.5 mM de dNTP, 30 pmol de cada uno de los cebadores 3 y 4, 5 unidades de Taq polimerasa LA (Takara) y proporcionaba el tampón GC I.

65

La condición de reacción fue mostrada más abajo. La Taq polimerasa LA fue añadida a la mezcla reactiva después de la fase 1.

ES 2 338 767 T3

Fase	Temperatura	Tiempo
1	98 °C	10 min.
2	96 °C	20 seg.
3	55 °C	45 seg.
4	72 °C	30 seg.
5	72 °C	10 min.
* La fase 2 a fase 4 fueron repetidas 30 veces.		

El fragmento de 1.9 kb amplificado por PCR fue aislado y clonado en pT7Blue produciendo pSG29.

El plásmido pSG29 fue digerido por *Bam*HI y *Xho*I y 1.9 kb de fragmento que contenía el gen LOX fue ligado con pMT2188 digerido con *Bam*HI y *Xho*I. El plásmido pMT2188 tiene un promotor de amilasa neutral de *Aspergillus niger* modificado, una secuencia guía TPI de *Aspergillus nidulans*, un terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, un gen amdS de *Aspergillus nidulans* como marcador para una transformación fúngica y ura3 de *S. cerevisiae* como marcador para la transformación de *E. coli*. La transformación se realizó con *E. coli* DB6507 donde el gen pyrF es deficiente y puede recibir un suplemento de Ura3 de *S. cerevisiae*. El plásmido resultante fue denominado pSG30.

Expresión de M. salvinii LOX en A. oryzae

El BECh2 de *A. oryzae* fue transformado con el plásmido pSG30 y los transformantes positivos de selección fueron aislados. Los transformantes fueron dispuestos en crecimiento en COVE 2-ar a 32°C durante 5 días e inoculados en 100 ml de MS-9 en matraz de agitación. Después del cultivo en agitación vigorosa a 32°C durante 1 día, 3 ml de cada cultivo fueron transferidos a 100 ml de MDU-2Bp en un matraz de agitación para un cultivo a 32°C durante 3 días. El caldo de cultivo fue centrifugado a 3500 r.p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante fue recogido.

Las actividades de la lipoxigenasa del sobrenadante fueron determinadas espectrofotométricamente tal y como se describió anteriormente.

Los transformantes positivos expusieron aproximadamente 100,000U/ml de caldo de cultivo mientras que la BE-Ch2 de *A. oryzae* no transformada no expuso ninguna actividad. El sobrenadante de cultivo también fue expuesto a un análisis de SDS-PAGE. Unos transformantes positivos expusieron una banda continua de 80-100 kDa que indicaba que la proteína era glicosilada en exceso. La BECh2 de *A. oryzae* no transformada no expuso ninguna banda significativa.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 338 767 T3

Ejemplo 3

Especificidad de sustrato de lipoxigenasa

- 5 Unos parámetros cinéticos para varios sustratos fueron determinados por métodos estándar para la lipoxigenasa de *M. salvinii*.

10

Sustrato	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_M (μM)	V_{max} /K_M ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\mu\text{M}$)
Acido linoleico	2.63	1	2.557
15 Linoleato de Na	2.07	0.41	5.061
Acido linoelaidico	Ninguna actividad	Ninguna actividad	Ninguna actividad
20 Acido linolénico	1.9	0.4	4.488
Acido eicosadienoico	2.02	11	0.177
25 Acido araquidónico	2.44	5.5	0.446
Cloruro de linoleoilo	0.97	12	0.080
30 Linoleato metilo	0.82	30	0.026
Acetato de linoleoilo	0.77	9	0.085
35 Alcohol de linoleoilo	1.4	8	0.175

40 En forma de comparación, un sustrato también fue probado con lipoxigenasa de soja.

45

Sustrato	V _{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K _M (μM)	V _{max} /K _M ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\mu\text{M}$)
40 Acido linoleico	12.3	230	0.054

50

55

60

65

ES 2 338 767 T3

Ejemplo 3

Dependencia de pH de actividad de la lipoxigenasa

- 5 La actividad relativa de la lipoxigenasa *M. salvinii* en diferentes valores de pH fue determinada por el ensayo FOX descrito anteriormente, usando los tampones siguientes: 50 mM de ácido cítrico/citrato de sodio (pH 2,21-3,73), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 5,30, 6,17), Tris/HCl (pH 7,01,8,02), NaCl/NaOH de glicilglicina (pH 9,33-11,0).

10

pH	Actividad relativa (%)
2.21	7.11
2.90	20.6
3.73	27.7
5.30	60.0
6.17	83.7
7.01	100
8.02	92.9
9.33	82.6
11.0	77.7

15

20

25

30

Ejemplo 4

35

Dependencia de temperatura de la actividad de la lipoxigenasa

El efecto de temperatura en la lipoxigenasa *M. salvinii* fue estudiado por incubación de 10 minutos a pH 7.0.

40

Temperatura	Actividad relativa (%)
25	50.1
40	90.0
50	100
60	99.6
70	60.4

45

50

55

60

65

ES 2 338 767 T3

Ejemplo 5

Efecto blanqueador de las lipoxigenasas

- 5 Se examinó el efecto blanqueador de *M. salvinii* LOX. La soja L1 fue incluida para realizar una comparación. El β -caroteno y la astaxantina fueron usados como pigmentos.

10

β -caroteno	Tiempo (min.)	<i>M. salvinii</i>	Soja L1
	0	0.3783	0.3575
	0.4	0.3791	0.3616
	0.8	0.3729	0.3601
	1.2	0.3702	0.362
	1.4	0.3685	0.3602
	1.8	0.3651	0.3602
	2.2	0.3633	0.3595
	2.6	0.3486	0.3595
	3	0.341	0.3594
$\Delta A_{470}/\text{min.}$		0.0121	0.00005
Actividad LOX		2.652	1.962

35

40

Astaxantina	Tiempo (min.)	<i>M. salvinii</i>	Soja L1
	0	0.5292	0.5026
	0.4	0.5244	0.5029
	0.8	0.5177	0.505
	1	0.5166	0.5025
	1.4	0.512	0.5013
	1.8	0.5004	0.4993
	2.2	0.4876	0.4985
	2.6	0.4714	0.4986
	3	0.4566	0.498
$\Delta A_{470}/\text{min}$		0.0239	0.0021
Actividad LOX		2.4952	2.018

65

Los resultados muestran que la LOX de *M. salvinii* blanquea las soluciones de pigmento. La LOX de soja expone un pequeño efecto de blanqueamiento.

Referencias citadas en la descripción

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 - EP 238023 A [0013] [0032] - JP H1129410 B [0023]
- WO 9600787 A [0013] [0032] - WO 0039322 A [0054]
- EP 244234 A [0013] [0032] - WO 98123000 A [0054]
15 - US 4769243 A [0022]

Literatura no patentada citada en la descripción

- 20 - **Su OIiw J.** *Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 21. 13072-79 [0003]
- **Whitehead et al.** *Cereal foods world*, 1995, vol. 40, no. 4. 193-197 [0022]
- **Feinberg, A. P. Vogelstein, B.** *Anal. Biochem.*, 1983, vol. 132, 6-13 [0035]
25 - **W. R. Pearson D. J. Lipman** Improved Tools for Biological Sequence Analysis *PNAS*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0038]
- **W. R. Pearson** Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA Methods in *Enzymology*, 1990, vol. 183, 63-98 [0038]
30 - **S.M. Hebsgaard et al.** *Nucleic Acids Research*, 1996, vol. 24, (17), 3439-3452 [0061]

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una 9-lipoxigenasa que es:

- 5
- a) un polipéptido codificado por una secuencia de ADN clonada en el plásmido pUC19 presente en *Escherichia coli* depositado como DSM 14139,
 - b) un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos como péptido maduro mostrada en la SEC ID NO:1,
 - 10 c) un análogo del polipéptido definido en (a) o (b) que:
 - i) tiene al menos 85% homología con dicho polipéptido,
 - 15 ii) es una variante alélica de dicho polipéptido, o
 - d) un polipéptido codificado por ADN que se hibridiza en condiciones de astringencia alta con una cadena complementaria de
 - 20 i) la secuencia de ADN clonada en el plásmido pUC19 presente en *Escherichia coli* depositada como DSM 14139 o
 - ii) la secuencia de ADN de SEC ID NO:1 codificante del polipéptido maduro.
- 25

2. Lipoxigenasa según la reivindicación 1 que es derivada de un hongo filamentoso, por ejemplo un *Ascomycota*, tal como una cepa de *Magnaporthe*, particularmente *M. salvinii*.

30 3. Lipoxigenasa según la reivindicación 1 o 2, que tiene al menos 90% de homología, preferiblemente al menos 95% de homología, con el péptido maduro expuesto en la SEC ID NO:1 o con el polipéptido codificado por una secuencia de ADN clonada en el plásmido pUC19 presente en *Escherichia coli* depositado como DSM 14139.

35 4. ADN comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica la lipoxigenasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. Polinucleótido que comprende:

- 40
- a) la secuencia de ADN parcial codificante de una lipoxigenasa madura clonada en un plásmido presente en *Escherichia coli* DSM 14139,
 - b) la secuencia de ADN parcial codificante de una lipoxigenasa madura expuesta en la SEC ID NO:1,
 - c) un análogo de la secuencia definida en a) o b) que codifica una lipoxigenasa y
 - 45 i) tiene al menos 85% de homología con dicha secuencia de ADN, o
 - ii) se hibridiza en una astringencia alta con una cadena complementaria de dicha secuencia de ADN,
 - 50 iii) es una variante alélica de la misma, o
 - d) una cadena complementaria de a), b) o c).

55 6. Constructo de ácido nucleico comprendiendo la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5 enlazado operativamente a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la lipoxigenasa en un huésped de expresión adecuado.

60 7. Vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 6, un promotor, y señales de parada transcripcionales y translacionales.

8. Célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 6 o el vector de la reivindicación 7.

65 9. Método para la producción de una lipoxigenasa comprendiendo el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 8 en condiciones que llevan a la producción de la lipoxigenasa, y la recuperación de la lipoxigenasa.

ES 2 338 767 T3

10. Método de preparación de una masa o de un producto horneado hecho a partir de una masa, comprendiendo la adición de la lipoxigenasa a la masa según cualquiera de reivindicaciones 1-3.

5 11. Composición de la masa comprendiendo la lipoxigenasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

12. Composición detergente comprendiendo un agente tensioactivo y la lipoxigenasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

10 13. Composición detergente de la reivindicación anterior donde el agente tensioactivo es aniónico.

14. Proceso para la oxidación de un ácido graso poliinsaturado comprendiendo la puesta en contacto del ácido con la lipoxigenasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en presencia del aire.

15 15. Uso del proceso de la reivindicación anterior para la síntesis de aromas con un toque verde o síntesis de hormonas vegetales.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 767 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S
5 <120> Lipoxigenasa
<130> 10148-WO
<160> 4
<170> Versión de patente 3.1
10 <210> 1
<211> 1973
<212> ADN
15 <213> *Magnaporthe saivinii*
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)
20 <223>
<220>
<221> péptido maduro
<222> (52)..()
25 <223>
<220>
<221> CDS
30 <222> (501)..(1970)
<223>

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 767 T3

<400> 1

5	atg cgc atc gga ctc ttg gcc ttc gcc gtc gcg gcg cgc tat gtg gaa Met Arg Ile Gly Leu Leu Ala Phe Ala Val Ala Ala Arg Tyr Val Glu	48
	-15 -10 -5	
10	gcg ctg cca gtc gcg agc gcc gaa gaa gtg gcc tcg tcg tcc gct ccg Ala Leu Pro Val Ala Ser Gly Glu Glu Val Ala Ser Ser Ser Ala Pro	96
	-1 1 5 10 15	
15	acg acg ctg ccc tcg acg tcg agc agc tct gcg ctt ccc tcc ccg acc Thr Thr Leu Pro Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Leu Pro Ser Pro Thr	144
	20 25 30	
20	aag tac acg ctt ccc cac gag gac ccc aac ccg gaa gcg agg aag gcc Lys Tyr Thr Leu Pro His Glu Asp Pro Asn Pro Glu Ala Arg Lys Ala	192
	35 40 45	
25	gag ata gcg tta aag agg gga ggg ttc ctc tac gga ccc tcc acc ctg Glu Ile Ala Leu Lys Arg Gly Gly Phe Leu Tyr Gly Pro Ser Thr Leu	240
	50 55 60	
30	ggc cag act acc ttt tac ccc agc ggg acc ctg ggg acc gcc atg tcg Gly Gln Thr Thr Phe Tyr Pro Ser Gly Thr Leu Gly Thr Ala Met Ser	288
	65 70 75	
35	caa cgc gac cag gcc ctc tgg ctc agg gat gca gag aac caa acg ata Gln Arg Asp Gln Ala Leu Trp Leu Arg Asp Ala Glu Asn Gln Thr Ile	336
	80 85 90 95	
40	aca gcg tat cgt gaa gcc aac gag aca ctg agg gat atc cag agc Thr Ala Tyr Arg Glu Ala Asn Glu Thr Leu Arg Asp Ile Gln Ser	384
	100 105 110	
45	gtatgtgtcg agccgtgttt atgcgtcca atcattctct gtgctcctgt ccgtcccgc ccggggttac agccaagccg attcagtagc taactcggaa tgtctggttt gctctgcag	441
	500	
50	cat gcc ggt ctc aag acg ctt gac gac ttc gcg ctc etc tac gac gcc His Gly Gly Leu Lys Thr Leu Asp Asp Phe Ala Leu Leu Tyr Asp Gly	548
	115 120 125	
55	cat tgg aaa gcg tcg gtc cca gag gga ata gaa aag gcc atg ctg agc His Trp Lys Ala Ser Val Pro Glu Gly Ile Glu Lys Gly Met Leu Ser	596
	130 135 140	
60	aac tac act tcg gac ctg ctc ttt tcc atg gag cgg ctc tcc aac aac Asn Tyr Thr Ser Asp Leu Leu Phe Ser Met Glu Arg Leu Ser Asn Asn	644
	145 150 155	
65	ccc tac agc ctc aag cgc ctc cat cca acc aag gac aag ctg ccg ttc Pro Tyr Ser Leu Lys Arg Leu His Pro Thr Lys Asp Lys Leu Pro Phe	692
	160 165 170	
70	agc gtc gag gac aag gtg gtc aag cag ctg acc gcc acg acg ctt gcg Ser Val Glu Asp Lys Val Val Lys Gln Leu Thr Ala Thr Thr Leu Ala	740
	175 180 185 190	
75	gcg ctc cac aag gcc ggc cgt ctc ttc ttc gtc gac cac agc gat cag Ala Leu His Lys Ala Gly Arg Leu Phe Phe Val Asp His Ser Asp Gln	788
	195 200 205	
80	aag aaa tac acg ccg cag gca ggt cgg tat gct gcg gcc tgc cag ggg Lys Lys Tyr Thr Pro Gln Ala Gly Arg Tyr Ala Ala Ala Cys Gln Gly	836
	210 215 220	
85	ctt ttc tat gtg gac gcg cgg tcc aat cag ttc ctg ccg ctg gcc atc Leu Phe Tyr Val Asp Ala Arg Ser Asn Gln Phe Leu Pro Leu Ala Ile	884
	225 230 235	
90	aag acc aac gtp gcc gca gac ctg acg tac acg cca ctc gac gac aag Lys Thr Asn Val Gly Ala Asp Leu Thr Tyr Thr Pro Leu Asp Asp Lys	932
	240 245 250	

ES 2 338 767 T3

aac gac tgg ctt ctg gcc aag atc atg ttc aac aac aat gac ctg ttc 980
 Asn Asp Trp Leu Leu Ala Lys Ile Met Phe Asn Asn Asn Asp Leu Phe 270
 255 260 265

5 tac tcg cag atg tac cat gtc ctg ttc cac acg gtt cca gaa atc gtg 1028
 Tyr Ser Gln Met Tyr His Val Leu Phe His Thr Val Pro Glu Ile Val 285
 275 280

10 cac atg gcc gcc atc cgg acg cta agc gag acg cac ccg gtg ctg gcc 1076
 His Met Ala Ala Ile Arg Thr Leu Ser Glu Ser His Pro Val Leu Ala 300
 290 295

15 gtg ctc aat cgg atc atg tat caa gcc tat gcg atc cgg cca gtg gcc 1124
 Val Leu Asn Arg Ile Met Tyr Gln Ala Tyr Ala Ile Arg Pro Val Gly 315
 305 310

gaa cgc atc ctg ttc aac ccg gcc ggg ttt tgg gac cag aac ctt gcc 1172
 Glu Arg Ile Leu Phe Asn Pro Gly Gly Phe Trp Asp Gln Asn Leu Gly 330
 320 325

20 ctg ccc gcc acg gcc gcc gtc gac ttt ctc agt tcc atc tac gcc cat 1220
 Leu Pro Ala Thr Ala Ala Val Asp Phe Leu Ser Ser Ile Tyr Ala His 350
 335 340 345

25 ggc gag gcc ggg ttc cgg gcc gcc tac gtg gaa aac aac ctg cgc aag 1268
 Gly Glu Gly Gly Phe Arg Ala Gly Tyr Val Glu Asn Asn Leu Arg Lys 365
 355 360

30 cgg ggg ctg gtg gcc gac acc ttt gcc gcc ccg gcg ctc ccg cac ttc 1316
 Arg Gly Leu Val Gly Asp Thr Phe Gly Gly Pro Ala Leu Pro His Phe 380
 370 375

35 ccc ttc tac gag gac gcc cag cgc gtc ctc ggg gcg atc cgc gcc ttc 1364
 Pro Phe Tyr Glu Asp Ala Gln Arg Val Leu Gly Ala Ile Arg Gly Phe 395
 385 390

atg cag gcc ttt gtc gac tcg acc tac ggg gcc gac gac gcc gcg ctg 1412
 Met Gln Ala Phe Val Asp Ser Thr Tyr Gly Gly Asp Asp Gly Ala Leu 410
 400 405

40 gcg cgc gac ttt gag ctg cag gac tgg gtg gcc gag gcc aac ggg ccg 1460
 Ala Arg Asp Phe Glu Leu Gln Asp Trp Val Ala Glu Ala Asn Gly Pro 430
 415 420 425

45 gcg cag gtg cgc gac ttc ccc acg gcg ccg ctg ccg gcg gcg gag gag 1508
 Ala Gln Val Arg Asp Phe Pro Thr Ala Pro Leu Arg Arg Arg Glu Glu 445
 435 440

50 ctg gtg gcc atc ctg acg cac ata gcc tgg aac acg gcc gcc gcg cac 1556
 Leu Val Gly Ile Leu Thr His Ile Ala Trp Asn Thr Gly Gly Ala His 460
 450 455

cac gtt cta aac cag ggg gcg ccc gtg cgc gcc tcg gcc gtg ctg ccg 1604
 His Val Leu Asn Gln Gly Ala Pro Val Arg Ala Ser Gly Val Leu Pro 475
 465 470 475

55 ctc cac ccg gcg gct ctt tac gcg ccc gtc ccg gcg gcc aag gcc gcc 1652
 Leu His Pro Ala Ala Leu Tyr Ala Pro Val Pro Ala Ala Lys Gly Ala 480
 485 490

60 gtc gcg tcc agc gac gcc ctg ctg gcg tgg ctg ccg gac gag gtc aaa 1700
 Val Ala Ser Ser Asp Gly Leu Leu Ala Trp Leu Pro Asp Glu Val Lys 510
 495 500 505

65 tcg gtg gag cag gtg tcg ctg ctg gcg cgc ttc aac cgc gcg cag gtt 1748
 Ser Val Glu Gln Val Ser Leu Leu Ala Arg Phe Asn Arg Ala Gln Val 525
 515 520

ES 2 338 767 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Trp Lys Ala ser val pro glu gly ile glu lys gly Met Leu ser Asn
130 135 140
Tyr Thr Ser Asp Leu Leu Phe Ser Met glu Arg Leu Ser Asn Asn Pro
145 150 155
Tyr Ser Leu Lys Arg Leu His Pro Thr Lys Asp Lys Leu Pro Phe Ser
160 165 170 175
val glu Asp Lys val val Lys Gln Leu Thr Ala Thr Thr Leu Ala Ala
180 185 190
Leu His Lys Ala Gly Arg Leu Phe Phe Val Asp His Ser Asp Gln Lys
195 200 205
Lys Tyr Thr Pro Gln Ala Gly Arg Tyr Ala Ala Ala Cys Gln Gly Leu
210 215 220
Phe Tyr Val Asp Ala Arg Ser Asn Gln Phe Leu Pro Leu Ala Ile Lys
225 230 235
Thr Asn Val Gly Ala Asp Leu Thr Tyr Thr Pro Leu Asp Asp Lys Asn
240 245 250 255
Asp Trp Leu Leu Ala Lys Ile Met Phe Asn Asn Asn Asp Leu Phe Tyr
260 265 270
Ser Gln Met Tyr His Val Leu Phe His Thr Val Pro Glu Ile Val His
275 280 285
Met Ala Ala Ile Arg Thr Leu Ser Glu Ser His Pro Val Leu Ala val
290 295 300
Leu Asn Arg Ile Met Tyr Gln Ala Tyr Ala Ile Arg Pro Val Gly Glu
305 310 315
Arg Ile Leu Phe Asn Pro Gly Gly Phe Trp Asp Gln Asn Leu Gly Leu
320 325 330 335
Pro Ala Thr Ala Ala Val Asp Phe Leu Ser Ser Ile Tyr Ala His Gly
340 345 350
Glu Gly Gly Phe Arg Ala Gly Tyr Val Glu Asn Asn Leu Arg Lys Arg
355 360 365
Gly Leu Val Gly Asp Thr Phe Gly Gly Pro Ala Leu Pro His Phe Pro
370 375 380
Phe Tyr Glu Asp Ala Gln Arg Val Leu Gly Ala Ile Arg Gly Phe Met
385 390 395

ES 2 338 767 T3

5 Gln Ala Phe Val Asp Ser Thr Tyr Gly Gly Asp Asp Gly Ala Leu Ala
 400 405 410
 Arg Asp Phe Glu Leu Gln Asp Trp Val Ala Glu Ala Asn Gly Pro Ala
 420 425 430
 10 Gln Val Arg Asp Phe Pro Thr Ala Pro Leu Arg Arg Arg Glu Glu Leu
 435 440 445
 Val Gly Ile Leu Thr His Ile Ala Trp Asn Thr Gly Gly Ala His His
 450 455 460
 Val Leu Asn Gln Gly Ala Pro Val Arg Ala Ser Gly Val Leu Pro Leu
 465 470 475
 20 His Pro Ala Ala Leu Tyr Ala Pro Val Pro Ala Ala Lys Gly Ala Val
 480 485 490 495
 Ala Ser Ser Asp Gly Leu Leu Ala Trp Leu Pro Asp Glu Val Lys Ser
 500 505 510
 30 Val Glu Gln Val Ser Leu Leu Ala Arg Phe Asn Arg Ala Gln Val Arg
 515 520 525
 Asp Arg Asn Gln Thr Val Arg Asn Met Phe Ala Ala Pro Glu Leu Leu
 530 535 540
 Ala Gly Asn Gly Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Asn Ala Arg Phe Val Glu
 545 550 555
 40 Glu Thr Gly Arg Ile Ser Arg Glu Ile Glu Gly Arg Gly Phe Asp Ser
 560 565 570 575
 45 Lys Gly Leu Ser Gln Gly Met Pro Phe Ile Trp Thr Ala Leu Asn Pro
 580 585 590
 50 Ala Val Asn Pro Phe Phe Leu Ser Ile
 595 600

- <210> 3
- 55 <211> 29
- <212> ADN
- <213> Artificial/desconocido
- <220>
- 60 <221> Característica de mezcla
- <223> Artificial
- <220>
- 65 <221> Característica de mezcla
- <223> Cebador 3

ES 2 338 767 T3

<400> 3

cgcggatcca tgcgcatcgg actcttggc

29

5

<210> 4

<211> 31

<212> ADN

10 <213> Artificial/desconocido

<220>

<221> Característica de mezcla

<223> Artificial

15

<220>

<221> Característica de mezcla

<223> Cebador 4

20

<400> 4

cccgctcgag ctagatgctc aggaaaaacg g

31

25

30

35

40

45

50

55

60

65