(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 920 752**

(51) Int. CI.:

C12N 9/38 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 18209686 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2022 EP 3473714**

(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:
09.08.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

CRAMER, JACOB FLYVHOLM y
LARSEN, MORTEN KROG

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 los codifican, y a sus usos, por ejemplo, en 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 beneficiosos del colon, 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 de 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 promotor de 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 en 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 alimentario 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 uso en la industria para mejorar complementos alimentarios 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 disolución 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 BIF3d3 que da como resultado la hidrólisis eficiente y producción muy baja de GOS cuando se ensaya en leche.

Las enzimas lactasas de *Bifidobacterium bifidum* descritas anteriormente tienen el inconveniente de requerir altas concentraciones de lactosa, tal como mayores que 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 de 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.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona 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 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1,

b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2,

c. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3,

en el que la longitud del polipéptido es 500 a 1038 restos de aminoácidos.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que los polipéptidos descritos aquí 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 *Bifidobacterium sp.* que promueve la salud, en el propio producto y/o en el ser humano o animal que consume el producto.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que es un fragmento truncado en el extremo C de SEQ ID NO: 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*, por ejemplo *Bacillus subtilis* cepa BG3594, y/o que es estable frente a truncamiento adicional durante el almacenamiento después de la formulación final.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, en el que dicho polipéptido consta como máximo de 980 restos de aminoácidos.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido consta como máximo de 975 restos de aminoácidos.

El polipéptido puede estar codificado por un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido como se describe aquí.

El polipéptido puede expresarse mediante un vector de expresión y/o un plásmido que comprende un nucleico como se describe aquí, o es capaz de expresar un polipéptido como se describe aquí.

El polipéptido puede expresarse mediante una célula capaz de expresar un polipéptido como se describe aquí.

El polipéptido puede expresarse mediante un método para expresar un polipéptido, comprendiendo el método la obtención de una célula tal como se describe aquí, y la expresión del polipéptido de la célula, y opcionalmente la purificación del polipéptido como se describe aquí.

El polipéptido puede estar en forma de una composición que comprende un polipéptido como se describe aquí, preferiblemente una composición alimentaria, más preferiblemente un producto lácteo.

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 truncamiento purificadas usando columna HyperQ eluida con un gradiente de NaCl.

La figura 3 muestra la relación de la actividad de transgalactosilación. La relación se calcula como la relación entre Abs420 con receptor presente dividido entre 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.

La figura 4 muestra la eficacia de generación de galactooligosacáridos (GOS) de variantes seleccionadas en una matriz de yogur a 30ºC 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 que presenta 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 NO: 1 (también denominada (BIF_917) aquí) es un fragmento truncado de 887 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 2 (también denominada (BIF_995) aquí) es un fragmento truncado de 965 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 3 (también denominada (BIF_1068) aquí) es un fragmento truncado de 1.038 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 4 (también denominada (BIF_1172) aquí) es un fragmento truncado de 1.142 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 5 (también denominada (BIF_1241) aquí) es un fragmento truncado de 1.211 aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 6 (también denominada (BIF_1326) aquí) es un fragmento truncado de 1.296 aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NO: 7 es el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa de Bifidobacterium bifidum

SEQ ID NO: 8 es una secuencia nucleotídica que codifica una lactasa extracelular de Bifidobacterium bifidum DSM20215

SEQ ID NO: 9 es la secuencia nucleotídica que codifica BIF_917

SEQ ID NO: 10 es la secuencia nucleotídica que codifica BIF_995

SEQ ID NO: 11 es la secuencia nucleotídica que codifica BIF 1068

SEQ ID NO: 12 es la secuencia nucleotídica que codifica BIF_1172

SEQ ID NO: 13 es la secuencia nucleotídica que codifica BIF_1241

SEQ ID NO: 14 es la secuencia nucleotídica que codifica BIF_1326

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

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

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

De acuerdo con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Debe tenerse en cuenta que, tal como se emplean aquí, 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.

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

"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.

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 medida puede realizarse de varias maneras, tal como por un método de HPLC como se muestra en los ejemplos. Cuando se comparan las medidas de la actividad transgalactosilante, se han realizado a una concentración inicial dada de lactosa, tal como, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% (p/p).

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

En el presente contexto, la expresión "relación de la actividad de transgalactosilación" se calculó usando ortonitrofenol-β-D-galactopiranósido (ONPG) de la forma siguiente: La relación se calcula como la relación entre Abs420 con el receptor presente dividido entre 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.

Relación de actividad de transgalactosilación = ($Abs420^{+celobiosa}$ / $Abs420^{-celobiosa}$)*100%, en la que $Abs420^{+celobiosa}$ es la absorbancia leída a 420 nm usando el método 3 descrito a continuación, incluyendo celobiosa en la reacción, y $Abs420^{-celobiosa}$ 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.

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 enzima, tal como 30 minutos después de la adición de enzima, tal como 60 minutos después de la adición de enzima, tal como 90 minutos después de la adición de enzima, tal como 120 minutos después de la adición de enzima, o tal como 180 minutos después de la adición de enzima.

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

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.

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, unido por enlace covalente a cualquiera de los grupos hidroxilo libres en la molécula de lactosa, o generada por transgalactosilación interna, por ejemplo formando alolactosa.

En el presente contexto, se ensayó la evaluación del rendimiento de los polipéptidos descritos aquí 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 de100 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 (Aria Minimaelk) y 1,4% (p/v) de ingrediente de suero de leche Nutrilac YQ-5075 (Aria). Para hidratar completamente Nutrilac YQ-5075, la mezcla se dejó en agitación durante 20 horas, y después se añadió fosfato de Na 20 mM pH 6,5 para asegurar un pH de 6,5. Esta base de yogur se usó pura o con varios suplementos, 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 43ºC durante 3 horas. La reacción se detuvo con 100 µl de Na2CO3 al 10%. Las muestras se almacenaron a -20ºC. 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: Carbopac 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 usó un jarabe de GOS (Vivanal 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.

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 disolución" se refiere a un polipéptido que es soluble en un disolvente sin precipitar fuera de la disolución. Un disolvente con esta finalidad incluye cualquier medio en el que puede encontrarse el polipéptido, tal como un amortiguador acuoso o disolución salina, un caldo de fermentación, o el citoplasma de un hospedante de expresión.

En el presente contexto, el término “estabilizante” significa cualquier estabilizante para estabilizar el polipéptido, por ejemplo un poliol, tal como, por ejemplo, glicerol o propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico (por ejemplo, un éster de borato aromático). En un aspecto, el estabilizante es glicerol.

En el presente contexto, la expresión "sustrato de hidrato de carbono" significa un compuesto orgánico de fórmula general $C_m(H_2O)_n$, 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 aquí se refiere a un polipéptido que es al menos 30% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90%, y al menos 95% puro, determinado por SDS-PAGE.

La expresión “polipéptido sustancialmente puro” significa aquí un preparado polipeptídico que contiene como máximo 10%, preferiblemente como máximo 8%, más preferiblemente como máximo 6%, más preferiblemente como máximo 5%, más preferiblemente como máximo 4%, como máximo 3%, aún más preferiblemente como máximo 2%, lo más preferiblemente como máximo 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 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. Aquí, 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 – por ejemplo, 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" con respecto a la presente invención incluye cualquier "microorganismo" que podría comprender una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas aquí 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 hospedante" -con respecto a la presente invención incluye cualquier célula que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas aquí 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 aquí. 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, disoluciones/suspensiones de cualquier leche o productos lácteos que comprenden lactosa, tales como leche entera o baja en grasa, leche desnatada, suero de leche, leche en polvo reconstituida, leche condensada, leche UHT, suero de leche, suero de leche impregnado, suero ácido, o nata. Preferiblemente, el sustrato lácteo es leche o una disolución 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 aquí 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 aquí 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. Puede seguirle una etapa de enfriamiento rápido. Un "producto alimentario" o "composición alimentaria" 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 alimentario 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 cualquier producto lácteo en el que 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 u 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. Coggill, A. Heger, J.E. Pollington, O.L. Gavin, P. Gunesekaran, 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 aquí, "una posición correspondiente a la posición" significa que se hace una alineación como la descrita aquí 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 NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

Tal como se utiliza aquí, "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, por ejemplo, SEQ ID NO: 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 aquí, las expresiones "secuencia de referencia" y "secuencia objeto" se emplean indistintamente.

Como se emplea aquí, "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 del tercer grupo.

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

Como se emplean aquí, 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 "/", por ejemplo, G303ED o G303E/D.

Las posiciones y sustituciones se enumeran con referencia, por ejemplo, a la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. Por ejemplo, se pueden encontrar posiciones equivalentes en otra secuencia alineando esta secuencia con SEQ ID NO: 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 SEQ ID NO: 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 técnica.

Como se emplea aquí, 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 aquí, "polipéptido" se emplea indistintamente con la terminología "secuencia de aminoácidos", "enzima", "péptido" y/o "proteína". Tal como se emplea aquí, "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 aquí, 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 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, y la secuencia de nucleótidos en cuestión preferiblemente es SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

Una "secuencia homóloga" incluye un polinucleótido o un polipéptido que tiene un cierto porcentaje, por ejemplo 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 cuando un aminoácido está 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 aquí, "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 heterodúplex de ARN/ADN, o un copolímero de ARN/ADN. Como se emplea aquí, "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 aquí, 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 hospedantes, tal como un hospedante de células de levadura u otros hospedantes de expresión de elección.

Como se emplea aquí, "célula transformada" incluye células, incluyendo tanto las células bacterianas como fúngicas, que han sido transformadas mediante el empleo de técnicas de ADN recombinante. La transformación se produce generalmente por inserción de una o más secuencias nucleotídicas 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 aquí, "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 aquí, el término "fragmento" se define aquí 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 aquí como un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos suprimidos del extremo amino y/o carboxilo del polipéptido de SEQ ID NO: 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 aquí 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 usando 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 entre 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 usando 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 usando 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 usadas son las matrices PAM (Dayhoff et al. (1978), Jones et al. (1992)), las matrices BLOSUM (Henikoff y Henikoff (1992) y la matrizGonnet (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 usando el algoritmo de 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 usando el algoritmo de alineación de 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 entre la "longitud de alineación", en el que 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 de Needleman-Wunsch, y la identidad de secuencias se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido entre la "longitud de alineación", en el que la longitud de alineación es la longitud de toda la alineación, incluyendo espacios y partes sobresalientes de las secuencias.

En aún otra realización, 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 entre la "longitud de alineación", en el que la longitud de alineación es la longitud de toda la alineación, incluyendo 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 por apertura de espacio:	20
Penalización por ampliación de espacio:	0,2
Penalización por finalización de espacio:	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.

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

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 los ajustes de alineación por pares VectorNTI

Ajustes	K-tuple	1
	Número de mejores diagonales	5
	Tamaño de ventana	5
	Penalización por espacio	3
	Penalización por apertura 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.

Polipéptidos

En un aspecto, se describe aquí 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 o por encima de una concentración de 3% p/p de concentración inicial de lactosa.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido, en el que el núcleo catalítico de la glucósido hidrolasa tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

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

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que contiene el dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532).

En un aspecto, se describe aquí 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 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, en el que dicho polipéptido consiste en un máximo de 980 restos de aminoácidos,

b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido consiste en un máximo de 975 restos de aminoácidos,

c. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, en el que dicho polipéptido consiste en un máximo de 1300 restos de aminoácidos,

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

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

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

En otro aspecto, se describe aquí 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 el que dicho polipéptido consiste en un máximo de 1300 restos de aminoácidos,

b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, en el que dicho polipéptido consiste en un máximo de 980 restos de aminoácidos,

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

d. un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 o la secuencia nucleotídica comprendida en 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 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos tiene al menos 68%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de 90% con la secuencia de aminoácidosmadura de SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de 90% con la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO:2.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de 96,5% con la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO:3.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de 96,5% con la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO:4.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que tiene 96,5% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO: 5.

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

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido, que procede de *Bifidobacterium bifidum*.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que tiene un pH óptimo de 6,5-7,5.

En un aspecto, se describe aquí un polipéptido que tiene un óptimo de temperatura de 30-60, tal como 42-60 grados Celcius.

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.

Se describen aquí polipéptidos que 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. Esto puede evaluarse 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 usando 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 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 SEQ ID NO: 8 en la composición puede determinarse detectando el fragmento procedente de SEQ ID NO: 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 en lo siguiente. El núcleo catalítico debe pertenecer al clan GH-A de familias de glucósido hidrolasa relacionadas. El clan GH-A se caracteriza por escindir 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 emanan de las hebras 4 y 7 del dominio de barril (Jenkins, 1995, FEBS Letters, 362 (3), págs. 281-5). La estructura global del barril TIM es un pliegue (β/α) de 8 veces que consta de 8 hebras beta y 8 hélices alfa. En un aspecto, el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa descrito aquí pertenece a cualquiera de las familias GH-2 y -35 de glucósido hidrolasas, que son todas las enzimas de barril TIM 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).

En un aspecto, los polipéptidos descritos aquí tienen actividad sobre enlaces de hidratos de carbono que tienen la conformación β(1→4). Esto efectivamente colocó las enzimas en la clase EC 3.2.1.23 de la IUBMB de β-galactosidasas. Esta actividad puede ser determinada, pero sin limitación, usando substratos sintéticos tales como para-nitrofenol-β-D-galactopiranósido (PNPG), orto-nitrofenol-β-D-galactopiranósido (ONPG) o β-D-galactopiranósido 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 incubarla con un sustrato, tal como lactosa, y medir la liberación de glucosa por un método tal como determinación enzimática, HPLC, TLC u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Con objeto de predecir entidades funcionales de polipéptidos, se pueden aplicar varios repositorios 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 repositorio público.

En un aspecto adicional, 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). En aún un aspecto adicional, se proporciona además un polipéptido que contiene los dominios Pfam Glyco_hidro2N (PF02837), Glyco_hidro (PF00703), Glyco_hidro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532). En aún un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido que contiene los dominios Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703) y Glyco_hydro 2C (PF02836) que constituyen el dominio catalítico del polipéptido.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido como el descrito aquí 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 37ºC y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180, tal como 180 minutos de reacción. En un aspecto adicional, el polipéptido procede de *Bifidobacterium bifidum*.

En un aspecto, el polipéptido o los polipéptidos descritos aquí 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 37ºC y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180, tal como 180 minutos de reacción

En un aspecto adicional, el o los polipéptidos descritos aquí 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, medido a una concentraciσn de 100 ppm en un ensayo basado en leche a 37ºC y 5% p/p de lactosa despuıs de 15, 30 o 180ºC, tal como 180 minutos de reacciσn.

En un aspecto, la actividad de 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 un aspecto adicional, el o los polipéptidos descritos aquí tienen una o más de las siguientes características:

a) 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 37ºC y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180ºC, tal como 180 minutos de reacción, y/o

b) tienen 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 37ºC y 5% p/p de lactosa después de 15, 30 o 180ºC, tal como 180 minutos de reacción.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, en el que dicho polipéptido consiste en un máximo de 1300 restos de aminoácidos. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, tal como en el que dicha identidad de secuencia es al menos 95%, tal como, por ejemplo, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o al menos 100% de identidad de secuencia, y en el que dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácidos. En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, en el que dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácidos. En aún otro aspecto, se proporciona un polipéptido en el que dicho polipéptido tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, tal como en el que dicho polipéptido tiene al menos 90%, tal como, por ejemplo, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, un polipéptido que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, tal como en el que dicho polipéptido tiene al menos 97%, tal como, por ejemplo, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. En un aspecto, se proporcionan los polipéptidos descritos aquí que consisten en como máximo 975 restos de aminoácidos, tales como, por ejemplo, como máximo 970 restos de aminoácidos, tales como como máximo 950 restos de aminoácidos, tales como como máximo 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, o como máximo 890 restos de aminoácidos como máximo. En un aspecto, se proporciona un polipéptido concreto que consiste en 887 o 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 SEQ ID NO: 2, tal como en el que dicha identidad de secuencia es al menos 98%, tal como, por ejemplo, al menos 99% o al menos 100% de identidad de secuencia, en el que dicho polipéptido consiste en como máximo 975 restos de aminoácidos, tal como, por ejemplo, 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 SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido consiste en como máximo de 975 restos de aminoácido.

En otro aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En aún un aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, o 5, especialmente un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, tal como en el que dicha identidad de secuencia es al menos 97%, tal como, por ejemplo, al menos 98%, al menos 99%, o al menos 100% de identidad de secuencia, en el que dicho polipéptido consiste en como máximo de 1300 restos de aminoácidos.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido en el que dicho polipéptido tiene al menos 98,5%, tal como al menos 99%, o al menos 99,5% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. En un aspecto, tal polipéptido consiste en como máximo 1290 restos de aminoácidos, tal como, por ejemplo, como máximo 1280, como máximo 1270, como máximo 1260, como máximo 1250, como máximo 1240, como máximo 1230, como máximo 1220, o como máximo 1215 restos de aminoácidos. En un aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que consiste en 1211 restos de aminoácidos.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido en el que dicho polipéptido tiene al menos 96%, tal como al menos 97%, tal como, por ejemplo, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4. En un aspecto, se proporciona un polipéptido que consiste en como máximo 1210 restos de aminoácidos, tal como, por ejemplo, como máximo 1200, como máximo 1190, como máximo 1180, como máximo 1170, como máximo 1160, como máximo 1150, o como máximo 1145 restos de aminoácidos, tal como 1142 restos de aminoácidos.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido en el que dicho polipéptido tiene al menos 96,5%, tal como al menos 97%, tal como, por ejemplo, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3. En un aspecto, un polipéptido que consiste en como máximo 1130 restos de aminoácidos, tales como, por ejemplo, como máximo 1120, como máximo 1110, como máximo 1100, como máximo 1090, como máximo 1080, como máximo 1070, como máximo 1060, como máximo 1050, como máximo 1055, o como máximo 1040 restos de aminoácidos. En un aspecto preferido, se proporciona un polipéptido que consiste en 1038 restos de aminoácidos.

En un aspecto adicional, los polipéptidos descritos aquí tienen una relación de actividad de transgalactosilación por encima de 100%, tal como por encima de 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. Coggill, A. Heger, J.E. Pollington, O.L. Gavin, P. Gunesekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman Nucleic Acids Research (2010) Database Issue 38:D211-222. Cada familia está representada por múltiples alineaciones de secuencia y

modelos de Markov ocultos (HMM). En u aspecto adicional, los presentes inventores han descubierto que el o los polipéptidos proporcionados aquí contienen uno o más de los dominios Pfam Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532). En un aspecto, el o los polipéptidos proporcionados aquí contienen Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig 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 aquí o con un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas aquí. La presente invención abarca, en particular, péptidos que tienen un grado de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, o 3, 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 SEQ ID NO: 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 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 la 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 aquí, en particular los de SEQ ID NO 1, 2 o 3 definidos a continuación.

Las secuencias, particularmente las de variantes, homólogos y derivados de SEQ ID NO: 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 silencioso y producen una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos 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 los 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 conservativa (sustitución y reemplazo se emplean aquí 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, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede ocurrir sustitución no conservativa, es decir, de una clase de resto por otro, o, alternativamente, que implica la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (denominada en lo sucesivo Z), ácido diaminobutírico ornitina (denominada en lo sucesivo B), norleucina ornitina (denominada en lo sucesivo O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Las sustituciones conservativas 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), aminoácidos hidroxilados (serina, treonina), aminoácidos grandes (fenilalanina y triptófano) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina).

En un aspecto, la secuencia polipeptídica usada 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 recombinante.

Los polipéptidos variantes incluyen un polipéptido que tiene un determinado porcentaje, por ejemplo al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o 2.

Los polipéptidos variantes incluyen un polipéptido que tiene un determinado porcentaje, por ejemplo al menos 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3, 4 o 5.

En un aspecto, los polipéptidos descritos aquí comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro codificado por la secuencia nucleotídica que codifica la transgalatosilasa contenida en

Bifidobacterium bifidum DSM20215 mostrada aquí como SEQ ID NO: 22. Todas las consideraciones y limitaciones relativas a las identidades de secuencia y funcionalidad expuestas desde el punto de vista de SEQ ID NO: 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 NO: 1, 2, 3, 4 o 5, y la secuencia nucleotídica en cuestión preferiblemente es SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

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 NO: 1, 2, 3, 4 o 5; en el que el fragmento tiene actividad transgalactosilante.

En un aspecto, un fragmento contiene al menos 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 restos de aminoácidos.

En otro aspecto, la longitud de la variante polipeptídica es de 500 a 1300 restos de aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante polipeptídica es de 600 a 1.300 aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante polipeptídica de 700 a 1300 aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante polipeptídica es de 800 a 1300 aminoácidos. En otro aspecto, la longitud de la variante polipeptídica es de 800 a 1300 aminoácidos.

Variantes polipeptídica de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5

En un aspecto, se proporciona una variante de SEQ ID NO: 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 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. Dichos polipéptidos variantes se denominan también aquí por conveniencia "polipéptido variante", "variante de polipéptido" o "variante". En un aspecto, los polipéptidos defidos aquí tienen una actividad transgalactosilante mejorada en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En otro aspecto, los polipéptidos definidos aquí tienen una velocidad de reacción mejorada en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, los polipéptidos y variantes definidos aquí presentan actividad enzimática. En un aspecto, los polipéptidos y los polipéptidos variantes descritos aquí comprenden actividad de transgalactosilación.

En un aspecto, la proporción de actividad transgalactosilante:actividad de 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 de 3% p/p.

En un aspecto, la relación actividad transgalactosilante:actividad de 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 de 3% p/p.

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

Se proporciona un polipéptido aislado y/o purificado que comprende un polipéptido o un polipéptido variante como se define aquí. En una realización, el polipéptido variante es una forma madura del polipéptido (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5). En un aspecto, las variantes incluyen un dominio en C terminal.

En un aspecto, un polipéptido variante como se define aquí incluye variantes en las que se han añadido o eliminado entre uno y alrededor de 25 restos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, un polipéptido variante definido aquí incluye variantes en las que se han sustituido, añadido o eliminado entre uno y 25 restos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en la que se ha sustituido cualquier número entre uno y alrededor de 25

aminoácidos. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en la que se ha sustituido cualquier número entre tres y doce aminoácidos. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en la que 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 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, el o los polipéptidos descritos aquí tienen la secuencia 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, el o los polipéptidos descritos aquí tienen la secuencia de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en la que 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 como el 5, tal como el 4, tal como el 3, tal como el 2, tal como el 1, en el extremo N terminal.

Las enzimas y sus variantes enzimáticas pueden caracterizarse por sus secuencias de ácidos nucleicos y polipeptídicas primarias, por modelado estructural tridimensional, y/o por su actividad específica. Las características adicionales de las variantes de polipéptido o del polipéptido definidas aquí 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 estándar conocidos por el especialista en este campo. En otro aspecto, las variantes demuestran características de comportamiento mejoradas con respecto al polipéptido con SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, tal como una mejor estabilidad a altas temperaturas, por ejemplo 65-85ºC.

Se proporciona una variante de polipéptido como se define aquí con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 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 NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

Nucleótidos

Los polipéptidos aislados que tienen actividad transgalactosilante como se ha indicado anteriormente pueden ser codificados por polinucleótidos que se hibridan en condiciones de muy baja rigurosidad, preferiblemente condiciones de baja rigurosidad, más preferiblemente condiciones de rigurosidad media, más preferiblemente condiciones de rigurosidad media-alta, incluso más preferiblemente condiciones de alta rigurosidad, y aún más preferiblemente condiciones de muy alta rigurosidad con i) la secuencia de ácido nucleico comprendida en SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifican el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5; ii) la secuencia de ADNc 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 SEQ ID NO: 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.

La secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 o una subsecuencia de la misma, así como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 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 de 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 estándar de transferencia Southern, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales 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 preferible al menos de 70 nucleótidos de longitud.

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, por ejemplo 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 de 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 ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S, biotina, o avidina).

Una genoteca de ADN genómico preparada a partir de dichos otros organismos puede cribarse, 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 ADN de dichos otros organismos puede separarse por electroforesis en gel de agarosa o de 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 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 o una de sus subsecuencias, el material portador se usa en una transferencia Southern.

Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia nucleotídica se hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde a la secuencia nucleotídica mostrada en SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13,

su cadena complementaria, o una de sus subsecuencias, en condiciones de muy baja a muy alta rigurosidad. 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 SEQ ID NO: 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 rigurosidad como prehibridación e hibridación a 42ºC en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 g/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 25% de formamida para muy bajas y bajas rigurosidades, 35% de formamida para rigurosidades medias y medias-altas, o 50% de formamida para altas y muy altas rigurosidades, siguiendo procedimientos estándar 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, 0,2% de SDS, preferiblemente al menos a 45ºC (muy baja rigurosidad), más preferiblemente al menos a 50ºC (baja rigurosidad), más preferiblemente al menos a 55ºC (rigurosidad media), más preferiblemente al menos a 60ºC (rigurosidad media-alta), incluso más preferiblemente al menos a 65ºC (alta rigurosidad), y lo más preferible al menos a 70ºC (rigurosidad muy alta).

En una realización particular, el lavado se lleva a cabo usando 0,2X SSC, 0,2% de SDS, preferiblemente al menos a 45ºC (rigurosidad muy baja), más preferiblemente al menos a 50ºC (baja rigurosidad), más preferiblemente al menos a 55ºC (rigurosidad media), más preferiblemente al menos a 60ºC (rigurosidad media-alta), incluso más preferiblemente al menos a 65ºC (alta rigurosidad), y lo más preferible al menos a 70ºC (rigurosidad muy alta). En otra realización particular, el lavado se lleva a cabo usando 0,1 X SSC, 0,2% de SDS, preferiblemente al menos a 45ºC (rigurosidad muy baja), más preferiblemente al menos a 50ºC (baja rigurosidad), más preferiblemente al menos a 55ºC (rigurosidad media), más preferiblemente al menos a 60ºC (rigurosidad media-alta), incluso más preferiblemente al menos a 65ºC (alta rigurosidad), y lo más preferible al menos a 70ºC (rigurosidad muy alta).

Para sondas cortas que tienen alrededor de 15 nucleótidos a alrededor de 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de rigurosidad se definen como prehibridación, hibridación, y lavado después de la hibridación, a alrededor de 5ºC a alrededor de 10ºC por debajo de la T_m calculada 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%, disolución de Denhardt 1X, 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 estándar de transferencia Southern.

Para sondas cortas que tienen una longitud de alrededor de 15 nucleótidos a alrededor de 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 5ºC hasta 10ºC por debajo de 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 rigurosidad.

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

El contenido de G+C de SEQ ID NO: 10 es 42%, y el contenido de G+C de SEQ ID NO: 11 es 44%. Para una rigurosidad 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 1,4ºC. Para determinar el grado de identidad requerido para que dos ADN se hibriden en condiciones de rigurosidad media a 42ºC, se utiliza la siguiente fórmula:

% de homología = 100 - [(T_m eficaz -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, por ejemplo 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%, de identidad de secuencia con el ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido como el descrito aquí. En un aspecto adicional, el ácido nucleico descrito aquí 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 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 99% idéntica a SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

En un aspecto, se proporciona un plásmido que comprende un ácido nucleico como se describe aquí.

En un aspecto, se proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico como se describe aquí, o capaz de expresar un polipéptido como se describe aquí.

Se proporciona un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de polipéptido definidas y expuestas aquí. Además, se proporciona un ácido nucleico capaz de hibridarse con el complemento. En otra realización, la secuencia para uso en los métodos y composiciones descritos aquí es una secuencia sintética. Incluye, pero no se limita a, secuencias obtenidas con un uso óptimo de codones para expresión en organismos hospedantes, tales como levaduras. Las variantes de polipéptido proporcionadas aquí pueden producirse por síntesis o por expresión recombinada en una célula hospedante, según procedimientos bien conocidos en la técnica. En un aspecto, el o los polipéptidos descritos aquí son el o los polipéptidos recombinantes. La variante de polipéptido expresada como se define aquí se aísla opcionalmente antes de su uso.

En otra realización, la variante de polipéptido como se define aquí se purifica después de la expresión. Los métodos de modificación genética y producción biotecnológica de variantes de polipéptido se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 7.371.552, nº 7.166.453; nº 6.890.572; y nº 6.667.065; y solicitudes publicadas de EE.UU. n° 2007/0141693; 2007/0072270; 2007/0020731; 2007/0020727; 2006/0073583; 2006/0019347; 2006/0018997; 2006/0008890; 2006/0008888; y 2005/0137111. Las enseñanzas relevantes de estas descripciones incluyen secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos, cebadores, vectores, métodos de selección, células hospedantes, purificación y reconstitución de variantes de polipéptido expresadas, y caracterización de variantes de polipéptido como se define aquí, incluyendo amortiguadores útiles, intervalos de pH, concentraciones de Ca^{2+}, concentraciones de sustrato y concentraciones de enzima para ensayos enzimáticos.

Se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de SEQ ID NO: 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 NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos alrededor de 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 NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

Vectores

El polinucleótido puede estar en forma de un vector que comprende un polinucleótido. En un aspecto, una célula bacteriana comprende el vector. En algunas realizaciones, una construcción de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante se transfiere a una célula hospedante en un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia codificante. El vector puede ser cualquier vector que se pueda integrar en un genoma de célula hospedante fúngica y se pueda replicar cuando se introduce en la célula hospedante. El Catálogo de Cepas FGSC, Universidad de Missouri, da una lista de vectores adecuados. Más ejemplos de vectores de expresión y/o de integración adecuados se proporcionan en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Bennett et al., MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991), p. 396-428; y patente EE.UU. nº 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 promotor adecuado, que permite la transcripción en la célula hospedante. El promotor puede proceder de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula hospedante. Ejemplos no limitativos adecuados de promotor incluyen promotor *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. En una realización, el promotor es aquel nativo a la célula hospedante. Por ejemplo, cuando *P. saccharophila* es el hospedante, el promotor es un promotor nativo de *P. saccharophila*. Un " promotor inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. En otra realización, el promotor es aquel que es heterólogo para la célula hospedante.

En algunas realizaciones, la secuencia codificante está operativamente unida a una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal. En otro aspecto, un péptido señal representativo es SEQ ID NO: 27. Un péptido señal representativo es SEQ ID NO: 9, que es la secuencia señal nativa del precursor aprE de Bacillus subtilis. En otras realizaciones, el ADN que codifica la secuencia señal se reemplaza por una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia señal de otros precursores extracelulares de Bacillus subtilis. En una realización, el polinucleótido que codifica la secuencia señal está inmediatamente en dirección 5' y en el marco del polinucleótido que codifica el polipéptido. La secuencia señal puede seleccionarse de la misma especie que la célula hospedante. En realizaciones adicionales, una secuencia señal y una secuencia promotora que comprende una construcción o vector de ADN que ha de introducirse en una célula hospedante 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 promotora proceden de la misma fuente. En otra realización, la secuencia de terminación es homóloga a la célula hospedante.

En algunas realizaciones, un vector de expresión incluye un marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen aquellos que confieren resistencia a agentes antimicrobianos, por ejemplo

higromicina o fleomicina. Los marcadores selectivos nutricionales 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 Penttila et al., Gene 61: 155-164 (1987).

Un vector de expresión adecuado que comprende una construcción de ADN con un polinucleótido que codifica una variante puede ser cualquier vector que sea capaz de replicarse de forma autónoma en un organismo hospedante dado o de integrarse en el ADN del hospedante. 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 promotor, la región codificante, 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 codificante para un gen o parte del mismo se inserta en este vector de expresión de uso general, de manera que está bajo el control transcripcional de las secuencias promotora y terminadora de la construcción de expresión. En algunas realizaciones, los genes o parte de los mismos se insertan en dirección 3' del promotor fuerte *cbh1*.

Hospedantes de expresión/células hospedantes

En otro aspecto, se proporciona una célula hospedante que comprende, preferiblemente transformada con, un plásmido como se describe aquí o un vector de expresión como se describe aquí.

En otro aspecto, se proporciona una célula capaz de expresar un polipéptido como se describe aquí.

En un aspecto, la célula hospedante como se describe aquí, o la célula como se describe aquí, es una célula bacteriana, fúngica o de levadura.

En otro aspecto, la célula hospedante 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 hospedante 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 hospedantes adecuadas incluyen una bacteria grampositiva 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 gramnegativa, en la que dicha bacteria gramnegativa es *Escherichia coli* o una especie de *Pseudomonas*. En un aspecto, la célula hospedante es una *B. subtilus* o *B. licheniformis*. En una realización, la célula hospedante 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 hospedante expresa el polinucleótido como se expone en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, una célula hospedante se modifica genéticamente para expresar una variante de polipéptido como se define aquí con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 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 NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica una variante de polipéptido como se define aquí tendrá una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos alrededor de 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 NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos alrededor der 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 NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

Métodos para producir polipéptidos

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

Una característica de expresión significa un nivel alterado de expresión de la variante, cuando la variante se produce en una célula hospedante particular. La expresión se refiere generalmente a la cantidad de variante activa que es recuperable de un caldo de fermentación empleando técnicas estándar 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 hospedante o segregada por la célula hospedante. La expresión también puede relacionarse con la velocidad de traducción del ARNm que codifica el polipéptido variante.

Transformación, expresión y cultivo de células hospedantes

La introducción de una construcción o vector de ADN en una célula hospedante incluye técnicas tales como transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, por ejemplo 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, por ejemplo, Ausubel et al. (1987), más arriba, capítulo 9; Sambrook et al. (2001), más arriba; 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); documento EP 244.234; y documento 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 hospedante. Los transformantes se purifican entonces mediante técnicas conocidas.

En un ejemplo no limitativo, 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 un ensayo adicional de estabilidad cultivando los transformantes en un medio sólido no selectivo, por ejemplo 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. Para seleccionar transformantes pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica.

Identificación de actividad

Para evaluar la expresión de una variante en una célula hospedante, los ensayos pueden medir la proteína expresada, el ARNm correspondiente o la actividad de β-galactosidasa. Por ejemplo, los ensayos adecuados incluyen transferencia Northern y Southern, RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), e hibridación in situ, usando una sonda de hibridación apropiadamente marcada. Los ensayos adecuados también incluyen la medida 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 aquí.

Métodos para purificar los polipéptidos descritos aquí

En general, una variante producida en el cultivo celular se segrega en el medio y puede purificarse o aislarse, por ejemplo, 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, incluyendo intercambio iónico de alta resolución, cromatografía de interacción hidrófoba, separación bifásica, precipitación con etanol, HPLC de 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 polipéptidos descritos pueden, por ejemplo, ser liofilizados o preparados en una disolución. En un aspecto, el o los polipéptidos descritos aquí están en forma liofilizada. En otro aspecto, el o los polipéptidos descritos están en disolución.

Composiciones, aplicación y uso

Métodos para inmovilizar y formular los polipéptidos descritos aquí

Las composiciones polipeptídicas pueden prepararse según métodos conocidos en la técnica, y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición polipeptídica 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.

La invención se refiere a un método para producir un producto alimentario tratando un sustrato que comprende lactosa con un polipéptido como se describe aquí.

En un aspecto, es un método para producir un producto lácteo tratando un sustrato lácteo que comprende lactosa con un polipéptido como se describe aquí.

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

La preparación enzimática, tal como en forma de ingrediente alimentario, puede estar en forma de disolución 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.

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

La preparación enzimática, tal como en forma de un ingrediente alimentario, puede estar en forma de disolución 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.

En un aspecto, se proporciona una composición, preferiblemente una composición alimentaria, más preferiblemente un producto lácteo que comprende una célula o un polipéptido como se describe aquí.

Además, se describe aquí una composición que comprende al menos 5%, tal como, por ejemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% p/p de uno o más polipéptidos como se describe aquí en base a la cantidad total de polipéptidos en la composición que tiene al menos 70%, por ejemplo, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 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 usando 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 SEQ ID NO: 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 derivados de SEQ ID NO: 8 en la composición puede determinarse detectando el fragmento derivado de SEQ ID NO: 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 consiste en un polipéptido que consiste en SEQ ID NO: 1, 2 y 3. En aún otro aspecto, la composición comprende uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en un polipéptido que consiste en SEQ ID NO: 1 y 2.

En un aspecto, la invención proporciona una preparación de complejo enzimático que comprende el complejo enzimático según la invención, un portador 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.

En un aspecto adicional, la preparación/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 aún otro aspecto, el azúcar es un hidrato de carbono de molécula pequeña, en particular cualquiera de varios de sabor dulce, tales como glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa.

Todavía en un aspecto adicional, la preparación 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, por ejemplo 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 usadas para poner en práctica la invención pueden inmovilizarse en diferentes medios, incluyendo agua, amortiguador de Tris-HCl y disolución amortiguada con fosfato. La enzima puede inmovilizarse en cualquier tipo de sustrato, por ejemplo 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 aquí. En un aspecto adicional, 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 un aspecto adicional, la actividad de transgalactosilación relativa es superior a 6 después de 30 min. de reacción. Todavía en un aspecto adicional, la actividad de transgalactosilación relativa es superior a 12 después de 30 min. de reacción. En un aspecto, se proporciona un método, en el que el tratamiento con un polipéptido como se describe aquí tiene lugar a una temperatura óptima para la actividad de la enzima. En un aspecto adicional, el polipéptido se añade al sustrato lácteo a una concentración de 0,01-1000 ppm. Aún en un aspecto adicional, el polipéptido se añade al

sustrato lácteo a una concentración de 0,1-100 ppm. En un aspecto adicional, 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 un aspecto adicional, el producto lácteo es yogur. En un aspecto adicional, 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 aquí. En un aspecto, el polipéptido definido aquí se añade en una concentración de 0,01-1000 ppm. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende un polipéptido inactivado como se define aquí. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende un polipéptido inactivado como se define aquí en una concentración de 0,01-1000 ppm. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende GOS formado in situ por un polipéptido como se define aquí. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende una célula como se define aquí. Un producto lácteo como se describe aquí puede ser, por ejemplo, leche desnatada, leche baja en grasa, leche entera, nata, 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, por ejemplo componentes vegetales tales como, por ejemplo, aceite vegetal, proteína vegetal, y/o hidratos de carbono vegetales. Los productos lácteos también pueden comprender aditivos adicionales, tales como, por ejemplo, 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 50% (peso/peso), tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 80%, preferiblemente al menos 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 aquí que tiene actividad transgalactosilante representan al menos 50% (peso/peso), tal como al menos 70%, por ejemplo 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 usado 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 no desnatado, 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 exterminar todos los microorganismos, incluyendo las esporas bacterianas. El tratamiento UHT (ultra alta temperatura) puede ser, por ejemplo, tratamiento térmico durante 30 segundos a 130ºC, o tratamiento térmico durante un segundo a 145ºC.

En una realización preferida de la invención, el producto lácteo es leche ESL. Leche ESL, en el presente contexto, es 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 2-5ºC.

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

Los microorganismos usados para la mayoría de los productos lácteos fermentados se seleccionan del grupo de bacterias denominadas generalmente bacterias del ácido láctico. Como se usa aquí, la expresión "bacteria del ácido láctico" designa una bacteria grampositiva, microaerófila o anaerobia, que fermenta azúcares con la producción de ácidos, incluyendo ácido láctico como el ácido producido predominantemente, ácido acético y ácido propiónico. Las bacterias del ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran dentro del orden "Lactobacillales", que incluyen *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 del ácido láctico, se incluyen generalmente en el grupo de bacterias del ácido láctico.

Las bacterias del ácido láctico se suministran normalmente a la industria láctea ya sea como cultivos congelados o liofilizados para propagación del iniciador en masa o como los denominados 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 del ácido láctico del cultivo iniciador usadas habitualmente se dividen generalmente en organismos mesófilas, que tienen temperaturas óptimas de crecimiento a alrededor de 30ºC, y organismos termófilos, que tienen temperaturas óptimas de crecimiento en el intervalo de alrededor de 40 a alrededor de 45ºC. Los organismos típicos que pertenecen al grupo mesófilo incluyen *Lactococcus lactis, Lactococcus lactis subsp. cremoris, Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris, Pseudoleuconostoc mesenteroides subesp. cremoris, Pediococcus pentosaceus, Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetilactis, Lactobacillus casei subsp. casei* y *Lactobacillus paracasei subesp. paracasei.* Las especies de bacterias termófilas del ácido láctico 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, que incluyen *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 del ácido láctico. Además, las especies de Propionibacteria 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 fúngicos, incluyendo cultivos de levaduras y cultivos de hongos filamentosos, que se utilizan particularmente en la fabricación de determinados tipos de quesos y bebidas. Ejemplos de hongos incluyen *Penicillium roqueforti, Penicillium candidum*, *Geotrichum candidum*, *Kéfir Torula, Kéfir Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización de la presente invención, el microorganismo usado 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 del proceso adecuadas, tales como temperatura, oxígeno, cantidad y características de microorganismo/s, aditivos tales como, por ejemplo, hidratos de carbono, saborizantes, minerales, enzimas, y tiempo del 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, por ejemplo, en el intervalo de 3,5-6, tal como en el intervalo de 3,5-5, preferiblemente en el intervalo de 3,8-4,8.

En un aspecto, se proporciona un método para usar los polipéptidos o usar uno cualquiera o más de los tipos celulares mencionados anteriormente para producir oligosacáridos. Los oligosacáridos comprenden, pero no se limitan a, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, isomaltooligosacáridos, maltooligosacáridos, 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, suplementos alimentarios, 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 aquí para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, producto de leche fermentado, suplemento alimentario, y producto comestible probiótico.

En un aspecto, los polipéptidos descritos aquí pueden usarse para preparar productos de queso, y en métodos para elaborar los productos de queso. Los productos de queso pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en queso crema, 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 alrededor de 25 por ciento, preferiblemente al menos alrededor de 50 por ciento, y más preferiblemente al menos alrededor de 75 por ciento. Los polipéptidos se pueden usar para reducir la lactosa en productos de queso a menos de alrededor de 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 aquí 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 aquí pueden reducir el índice glucémico de los productos de queso debido a que 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

crema, debido a que los GOS proporcionan sorprendentemente una textura mejorada al producto de queso crema, permitiendo así el uso reducido de estabilizantes, o permitiendo un aumento del contenido de humedad sin sinéresis.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende un polipéptido como se describe aquí y un sustrato de hidrato de carbono. En un aspecto adicional, el sustrato de hidrato de carbono es un disacárido. En un aspecto adicional, el disacárido es, por ejemplo, lactulosa, trehalosa, ramnosa, maltosa, sacarosa, lactosa o celobiosa. En aún un aspecto adicional, el sustrato de hidrato de carbono es lactosa. La composición se prepara de manera que se producen oligosacáridos. El polipéptido como se describe aquí puede ser parte de un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, suplementos alimentarios, y productos comestibles probióticos. En un aspecto, se proporciona una composición que comprende un polipéptido como se describe aquí y un estabilizante. Ejemplos de estabilizantes son, por ejemplo, un poliol, tal como, por ejemplo, glicerol o propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico (por ejemplo, un éster de borato aromático).

En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido transgalactosilante como se describe aquí, o una célula como se describe aquí, para producir galactooligosacáridos. En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido transgalactosilante como se describe aquí, o una célula como se describe aquí, para producir galactooligosacáridos para formar parte de un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, suplementos alimentarios, 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 aquí, o una célula como se describe aquí, para producir galactooligosacáridos para aumentar el crecimiento de Bifidobacterium. En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido transgalactosilante como se describe aquí, o una célula como se describe aquí, 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 aquí, que comprende cultivar una célula como se describe aquí 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 aquí, o una célula como se describe aquí, con una disolución a base de leche 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, en los que se desea un elevado 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 reducirse 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 polipéptidos transgalactosilantes como se describen aquí pueden 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 polipéptidos transgalactosilantes como se describen aquí 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 polipéptidos transgalactosilantes como se describen aquí, especialmente a bajas concentraciones de lactosa. Una lactasa, en el contexto de la presente invención, es cualquier glucósido hidrolasa con capacidad de hidrolizar el disacárido lactosa en los 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, por ejemplo, EC 3.2.1.23, también pueden ser lactasas en el contexto de la presente invención. Una lactasa en el contexto de la invención puede tener actividades distintas 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 usar 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, por ejemplo, de una cepa de Agaricus, por ejemplo A. bisporus; Ascovaginospora; Aspergillus, por ejemplo A. niger, A. awamori, A. foetidus, A. japonicus, A. oryzae; Candida; Chaetomium; Chaetotomastia; Dictyostelium, por ejemplo D. discoideum; Kluveromyces, por ejemplo K. fragilis, K. lactis; Mucor, por ejemplo M. javanicus, M. mucedo, M. subtilissimus; Neurospora, por ejemplo N. crassa; Rhizomucor, por ejemplo R. pusillus; Rhizopus, por ejemplo R. arrhizus, R. japonicus, R. stolonifer; Sclerotinia, por ejemplo S. libertiana; Torula; Torulopsis; Trichophyton, por ejemplo T. rubrum; Whetzelinia, por ejemplo W.

sclerotiorum; Bacillus, por ejemplo B. coagulans, B. circulans, B. megaterium, B. novalis, B. subtilis, B. pumilus, B. stearothermophilus, B. thuringiensis; Bifidobacterium, por ejemplo B. longum, B. bifidum, B. animalis; Chryseobacterium; Citrobacter, por ejemplo C. freundii; Clostridium, por ejemplo C. perfringens; Diplodia, por ejemplo D. gossypina; Enterobacter, por ejemplo E. aerogenes, E. cloacae Edwardsiella, E. tarda; Erwinia, por ejemplo E. herbicola; Escherichia, por ejemplo E. coli; Klebsiella, por ejemplo K. pneumoniae; Miriococcum; Myrothesium; Mucor; Neurospora, por ejemplo N. crassa; Proteus, por ejemplo P. vulgaris; Providencia, por ejemplo P. stuartii; Pycnoporus, por ejemplo Pycnoporus cinnabarinus, Pycnoporus sanguineus; Ruminococcus, por ejemplo R. torques; Salmonella, por ejemplo S. typhimurium; Serratia, por ejemplo S. liquefasciens, S. marcescens; Shigella, por ejemplo S. flexneri; Streptomyces, por ejemplo S. antibioticus, S. castaneoglobisporus, S. violeceoruber; Trametes; Trichoderma, por ejemplo T. reesei, T. viride; Yersinia, por ejemplo Y. enterocolitica. En una realización, la lactasa es un componente intracelular de microorganismos como Kluyveromyces y Bacillus. Kluyveromyces, especialmente K. fragilis y K. lactis, y otros hongos, tales como los de los géneros Candida, Torula y Torulopsis, son una fuente común de lactasas fúngicas, mientras que B. coagulans y B. circulans son fuentes bien conocidas de lactasas bacterianas. Están disponibles varias preparaciones comerciales de lactasa procedentes de estos organismos, tales como Lactozym.RTM. (disponible de Novozymes, Dinamarca), HA-Lactase (disponible de Chr. Hansen, Dinamarca) y Maxilact.RTM. (disponible en DSM, Países Bajos), todos de K. lactis. Todas estas lactasas se denominan lactasas neutras, que tienen un pH óptimo entre pH 6 y pH 8. Cuando tales lactasas se usan en la producción de, por ejemplo, yogur bajo en lactosa, el tratamiento enzimático tendrá que realizarse en una etapa independiente antes la fermentación, o tendrán que usarse dosis enzimáticas bastante elevadas, debido a su reducción de actividad ya que 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.

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Método 1

Producción de polipéptido

Los genes sintéticos diseñados para codificar el gen de *Bifidobacterium bifidum* de longitud completa (1752 restos) con codones optimizados para la expresión en *Bacillus subtilis* se adquirieron de GeneART (Regensburg, Alemania) SEQ ID NO 8.

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

Cebador directo: GGGGTAACTAGTGGAAGATGCAACAAGAAG (SpeI subrayada) (SEQ ID NO: 15).

Cebadores inversos:

Mutante de truncamiento	Secuencia del cebador
BIF917 (SEQ ID NO: 9)	GCGCTTAATTAATTATGTTTTTTCTGTGCTTGTTC SEQ ID NO: 16
BIF995 (SEQ ID NO: 10)	GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTTCATCAATCA 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)	GCGCTTAATTAATTAAAATTCTTGTTCTGTGCCCA SEQ ID NO: 20
BIF1478 (SEQ ID NO: 14)	GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTTCGCTTGCGC SEQ ID NO: 21

El gen sintético se clonó en el vector de expresión pBNspe de *Bacillus subtilis* usando los sitios de restricción únicos SpeI y PacI (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.

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

Las células se lisaron por adición directamente a los medios de cultivo de concentraciones finales de 1 mg/ml de Lisozima (Sigma-Aldrich) y 10 U/ml de Benzonasa (Merck), y se incubaron durante1 hora a 33ºC a 180 rpm. Los lisados se purificaron por centrifugación a 10.000 x g 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
Lleve hasta	500 ml por litro
Parte II	
K_2HPO_4 1M	3 mL
Glucosa	75 g
Urea	3,6 g
MOPS 10X de Grant	100 mL
Lleve hasta 400 ml por litro	

La Parte I (2% p/p de Soytone) se preparó y se sometió a autoclave durante 25 minutos a 121ºC.

La Parte II se preparó y se mezcló con la Parte 1, y el pH se ajustó a pH a 7,3 con HCl/NaOH.

El volumen se llevó al volumen total, y se esterilizó a través de un filtro de PES de 0,22 µm.

El amortiguador MOPS 10x se preparó según las siguientes instrucciones:

83,72 g	Tricina
7,17 g	Peletes de KOH
12 g	NaCl
29,22 g	K2SO4 0,276 M
10 ml	MgCl2 0,528M
10 ml	Micronutrientes 100X de Grant

Lleve hasta aprox. 900 ml con agua, y disuelva. Ajuste el pH a 7,4 con KOH, llene hasta 1 l, y filtre de forma estéril la disolución a través del filtro de PES de 0,2 µm.

Micronutrientes 100 x se preparó según las siguientes instrucciones:

Citrato sódico.2H2O	1,47 g
CaCl2.2H2O	1,47 g
FeSO4.7H2O	0,4 g
MnSO4.H2O	0,1 g
ZnSO4.H2O	0,1 g
CuCl2.2H2O	0,05 g
CoCl2.6H2O	0,1 g
Na2MoO4.2H2O	0,1 g

Disuelva y ajuste el volumen a 1 l con agua.

La esterilización se realizó a través de un filtro de PES de 0,2 µm.

El almacenamiento se realizó a 4ºC evitando la luz.

Método 2

Purificación y preparaciones enzimáticas

El aislado enzimático filtrado se concentró usando un dispositivo de ultrafiltración VivaSpin, con un corte de MW de 10 kDa (Vivaspin 20, Sartorius, lote nº 12VS2004), y el concentrado se cargó en una columna de desalado PD10 (GE Healthcare, lote nº 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 amortiguador 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 usando Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 NaCl 500 mM. La proteína en el flujo que atraviesa y en la elución se analizó para determinar la actividad de β-galactosidasa y por SDS-PAGE.

Se usaron geles de SDS-PAGE con el gel de Bis-Tris al 4-12% NuPage® Novex de Invitrogen 1,0 mm, 10 pocillos (Cat nº NP0321box), patrón previamente teñido See-Blue® Plus2 (Cat nº LC5925), y amortiguador NuPAGE® MES SDS (Cat nº NP0002), según el protocolo del fabricante. Los geles se tiñeron con Simply Blue Safestain (Invitrogen, Cat nº LC6060) (figura 2).

Método 3

Medida de la actividad de β-galactosidasa

La actividad enzimática se midió utilizando el sustrato comercialmente disponible 2-Nitrofenil-β-D-Galactopiranósido (ONPG) (Sigma N1127).

ONPG sin receptor

100	mM KPO4 pH6,0
12,3	mM ONPG

ONPG enriquecido con receptor

100	mM KPO4 pH6.0
20	mM Celobiosa
12,3	mM ONPG

Disolución STOP

10% de Na_2CO_3

Se añadieron 10 µl de series de dilución de enzima purificada en pocillos de placas de microtitulación que contenían 90 µl de amortiguador ONPG con o sin receptor. Las muestras se mezclaron y se incubaron durante 10 min a 37ºC, posteriormente se añadieron 100 µl de disolución STOP a cada pocillo, para terminar la reacción. Las medidas de la absorbancia se registraron a 420 nm en un lector de placas Molecular Device SpectraMax controlado por el paquete de programa informático Softmax.

La relación de actividad de transgalactosilación se calculó como sigue:

Relación de actividad de transgalctosilación = (Abs $420^{+Celobiosa}$/Abs $420^{-Celobiosa}$) *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:

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

Reactivos:

Amortiguador MES pH 6,4 (MES 100 mM pH 6,4, $CaCl_2$ 10 mM): Disuelva 19,52 g de hidrato de MES (Mw: 195,2 g/mol, Sigma-Aldrich nº M8250-250G) y 1,470 g de dihidrato de $CaCl_2$ (Mw: 147,01 g/mol, Sigma-Aldrich) en 1000 ml de H2Odd, ajuste el pH a 6,4 con NaOH 10 M. Filtre la disolución a través de filtro de 0,2 µm, y almacene a 4ºC hasta 1 mes.

Sustrato ONPG pH 6,4 (ONPG 12,28 mM, MES 100 mM pH 6,4, $CaCl_2$ 10 mM): Disuelva 0,370 g de 2-o-nitrofenil-βD-galactopiranósido (ONPG, Mw: 301,55 g/mol, Sigma-Aldrich nº N1127) en 100 ml de amortiguador MES pH 6,4, y almacene en la oscuridad a 4ºC durante un máximo de 7 días.

Reactivo Stop (10% de Na_2CO_3): Disuelva 20,0 g de Na_2CO_3 en 200 ml de H2Odd, filtre la disolución a través de filtro de 0,2 µm, y almacene a TA hasta 1 mes.

Procedimiento:

Se hicieron series de dilución de la muestra enzimática en el amortiguador MES a pH 6,4, y se transfirieron 10 µl de cada dilución de muestra a los pocillos de una placa de microtitulación (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 37ºC 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 amortiguador 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 (lector de placas SpectraMax, Molecular Device) frente al blanco.

Cálculo de la actividad enzimática:

Se determinó el coeficiente de extinción molar de 2-o-nitrofenol (Sigma-Aldrich nº 33444-25G) en amortiguador MES pH 6,4 ($0{,}5998 \times 10^{-6}$ $M^{-1} \times cm^{-1}$). Una unidad (U) de actividad de lactasa (LAU) se definió como la correspondiente a la hidrólisis de 1 nmol de ONPG por minuto. Usando placas de microtitulación 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:

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

Cálculo de la actividad específica para BIF917, mostrada aquí como SEQ ID NO: 1:

Determinación de la concentración de BIF917:

La cuantificación de la enzima diana (BIF917) y los productos de truncamiento se determinaron usando el sistema de SDS-PAGE Criterion Stain Free (BioRad). Se usó el gel Stain free precast Gel de cualquier kD 4-20% de Tris-HCl, 18 pocillos (Comb. nº 345-0418) con un amortiguador Serva Tris-Glicina/SDS (BioRad cat. nº 42529). Se usaron geles con los siguientes parámetros: 200 V, 120 mA, 25 W, 50 min. Se usó BSA (1,43 mg/ml) (Sigma-Aldrich, cat. nº 500-0007) como patrón de proteína, y se usó Criterion Stain Free Imager (BioRad) con el programa informático Image Lab (BioRad) para el análisis cuantitativo usando intensidad de banda con correlación del contenido de triptófano.

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 usando 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

ID de la muestra	Enzima	Fermentación	Factor de dilución	Actividad	Concentración de proteína (BIF917)	Concentración de proteína (BIF917)	Actividad específica	Actividad específica
				LAU/ml	mg/ml	ppm	LAU/mg	LAU/ppm
1	BI 917	a	5	26,9	1,23	1232	21,9	0,0219
2	BI 917	a	10	53,9	2,44	2437	22,1	0,0221
3	BI 917	a	10	75,4	3,56	3556	21,2	0,0212
4	BI 917	a	20	163,9	7,78	7778	21,1	0,0211
5	BI 917	a	30	233,6	11,06	11065	21,1	0,0211
6	BI 917	b	5	30,26825	1,34	1342	22,6	0,0226
7	BI 917	b	10	55,91536	2,61	2607	21,4	0,0214
8	BI 917	b	10	76,96056	3,70	3697	20,8	0,0208
9	BI 917	b	20	156,986	7,75	7755	20,2	0,0202
10	BI 917	b	30	236,9734	11,45	11452	20,7	0,0207
						Arg	21,3	0,0213
						Std.	0,700976	0,000701

EJEMPLOS

Ejemplo 1

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

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

La relación de actividad de transgalactosilación ($(Abs420^{+Celobiosa}/Abs420^{-Celobiosa})*100$) se calculó 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 1241 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 1241 restos muestran una relación de actividad de transgalactosilación inferior al 100%, lo que indica que estas variantes son predominantemente hidrolíticas. BIF_917 y BIF_995 tienen la mayor relación de actividad de transgalactosilación, de alrededor del 250%.

Ejemplo 2

GOS generado en una matriz de yogur

La evaluación de las enzimas BIF en la producción de GOS se evaluó en una simulación de aplicación de yogur. Ambos experimentos en lotes con un volumen de 100 µl 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 reciente (Mini-mælk, Aria Foods, Dinamarca) y 1,4% (p/v) de ingrediente de suero de leche Nutrilac YQ-5075 (Aria). Para hidratar completamente Nutrilac YQ-5075, la mezcla se dejó en agitación durante 20 horas, y después se añadió fosfato de Na 20 mM pH 6,5, para asegurar un pH de 6,5. Esta base de leche se usó pura, y se determinó que la concentración de lactosa era de 5,5% (p/v), lo que corresponde a 5,3% (p/p) en esta disolución. La siguiente correlación es válida en el presente ejemplo: lactosa al 1% (p/v) = 0,9587% (p/p) de lactosa. Se mezclaron 90 µl de la base de leche con 10 µl de las enzimas purificadas, se sellaron con cinta adhesiva, y se incubaron a 43ºC durante 3 horas. La reacción se interrumpió con 100 µl de Na_2CO_3 al 10%. Las muestras se almacenaron a -20ºC.

Método de HPLC

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 de IC fueron los siguientes: Fase móvil: NaOH 150 mM, Caudal: Isocrático, 0,25 ml/min, Columna: Carbopac PA1, Temperatura de la columna: RT, 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 de área del pico del patrón. Para la cuantificación de GOS, se usó un jarabe de GOS (Vivanal GOS, Friesland Campina) como patrón. En este ejemplo, el término "GOS" se define como galactooligosacáridos con un grado de polimerización (GP) de 3 o superior.

Resultados

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 de 1,2% (p/v) en comparación con BIF_1326 que genera menos del 0,1% (p/v).

Ejemplo 3

Patrón de degradación de variantes de truncamiento

Se solicitó 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 de SDS_PAGE, y se visualizaron con Simply Blue Safestain (Invitrogen, Cat nº LC6060) (Figura 5).

Resultados

Sorprendentemente, la mayoría de las variantes se modificaron proteolíticamente en el caldo final, apareciendo cantidades variables de banda diana 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 extremo C terminal, correspondiendo BIF917 a los extremos de SEQ ID NO: 1, correspondiendo BIF995 a los extremos de SEQ ID NO: 2, y correspondiendo BIF1068 a los extremos de SEQ ID NO: 3.

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

Con el fin de detectar el extremo C terminal, la proteína de interés se prepara para el análisis usando nuestro procedimiento básico para la caracterización de proteínas (A2963), con un cambio que usa 40% de ^{18}O-agua en el amortiguador 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. Sin embargo, el extremo C terminal de la proteína 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 extremo C terminal se cartografía usando análisis de MS/MS.

Tabla 2:

Variantes			
Nombre	Fragmento de SEQ ID NO: 6		POCILLO
BIF1230	1	1201	A01
BIF1231	1	1202	B01
BIF1232	1	1203	C01
BIF1233	1	1204	
BIF1234	1	1205	
BIF1235	1	1206	D01
BIF1236	1	1207	
BIF1237	1	1208	E01
BIF1238	1	1209	F01
BIF1239	1	1210	G01
BIF1240	1	1211	A02
BIF1241	1	1212	B02
BIF1242	1	1213	C02
BIF1243	1	1214	
BIF1244	1	1215	E02
BIF1245	1	1216	F02
BIF1246	1	1217	G02
BIF1247	1	1218	H02
BIF1248	1	1219	A03
BIF1249	1	1220	B03
BIF1250	1	1221	C03

Variantes			
Nombre	Fragmento de SEQ ID NO: 6		POCILLO
BIF1251	1	1222	D03
BIF1252	1	1223	E03
BIF1253	1	1224	
BIF1254	1	1225	F03
BIF1255	1	1226	G03
BIF1256	1	1227	H03
BIF1257	1	1228	A04
BIF1258	1	1229	B04
BIF1259	1	1230	C04
BIF1260	1	1231	D04
BIF1261	1	1232	
BIF1262	1	1233	E04
BIF1263	1	1234	F04
BIF1264	1	1235	G04
BIF1265	1	1236	H04
BIF1266	1	1237	A05
BIF1267	1	1238	B05
BIF1268	1	1239	C05
BIF1269	1	1240	D05
BIF1270	1	1241	E05
BIF1271	1	1242	F05
BIF1272	1	1243	G05
BIF1273	1	1244	H05
BIF1274	1	1245	A06
BIF1275	1	1246	B06
BIF1276	1	1247	C06
BIF1277	1	1248	D06
BIF1278	1	1249	E06
BIF1279	1	1250	
BIF1280	1	1251	F06
BIF1281	1	1252	G06
BIF1282	1	1253	H06
BIF1283	1	1254	A07

Variantes			
Nombre	Fragmento de SEQ ID NO: 6		POCILLO
BIF1284	1	1255	
BIF1285	1	1256	
BIF1286	1	1257	
BIF1287	1	1258	B07
BIF1288	1	1259	
BIF1289	1	1260	C07
BIF1290	1	1261	D07
BIF1291	1	1262	
BIF1292	1	1263	E07
BIF1293	1	1264	
BIF1294	1	1265	
BIF1295	1	1266	F07
BIF1296	1	1267	G07
BIF1297	1	1268	
BIF1298	1	1269	H07
BIF1299	1	1270	A08
BIF1300	1	1271	B08
BIF1301	1	1272	C08
BIF1302	1	1273	D08
BIF1303	1	1274	E08
BIF1304	1	1275	F08
BIF1305	1	1276	G08
BIF1306	1	1277	H08
BIF1307	1	1278	A09
BIF1308	1	1279	B09
BIF1309	1	1280	
BIF1310	1	1281	
BIF1311	1	1282	
BIF1312	1	1283	C09
BIF1313	1	1284	
BIF1314	1	1285	
BIF1315	1	1286	D09
BIF1316	1	1287	E09

Variantes			
Nombre	Fragmento de SEQ ID NO: 6		POCILLO
BIF1317	1	1288	F09
BIF1318	1	1289	G09
BIF1319	1	1290	H09
BIF1320	1	1291	A10
BIF1321	1	1292	B10
BIF1322	1	1293	C10
BIF1323	1	1294	D10
BIF1324	1	1295	E10
BIF1325	1	1296	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.

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-glactosidasa 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.

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 reciente (no orgánica) baja en grasa (Mini-mælk 0,5% de grasa, Aria Foods Amba, Dinamarca) y 1,4% (p/v) de ingrediente de suero Nutrilac YQ-5075 (Aria Foods Ingredients, Dinamarca), dando como resultado una concentración de lactosa de 5,5% (p/v), correspondiente a 5,3% (p/p) (1% (p/v) de lactosa = 0,9587% (p/p) en esta disolución). Para hidratar completamente Nutrilac YQ-5075, la mezcla se dejó en agitación suave durante 20 h a 4ºC. En el experimento inicial se usó un cultivo YO-MIX 485LYO liofilizado consistente en *Lactobacillus delbrüeckii 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, Aria 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 43ºC, y terminó después de 10 h por enfriamiento rápido en hielo. Las fermentaciones se realizaron siempre por duplicado, 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 4ºC.

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 conduce a un aumento del contenido de GOS y a una disminución de la cantidad de DP2 (incluyendo 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) yGOS (DP3+) en un yogur fermentado tratado con dosis crecientes de BIF917 y BID995. Todos los resultados se calculan como un promedio de tres medidas independientes.

		Cantidad %p/v DP2 incl. Lactosa	Std	Cantidad %p/v GOS (DP3+)	Std
Yogur	BIF917_10 ppm	2,191	0,092	1,249	0,051
	BIF917_20 ppm	1,296	0,047	1,882	0,056
	BIF917_40ppm	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
	H20	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 mayor concentración inicial de lactosa, de 7,5% p/v (correspondiente a 7,1% p/p, como 1% p/v de lactosa = 0,9423% p/p en esta disolución), 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 4-5ºC, se deja hidratar durante 20 horas a 4ºC.

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

3. La base de leche se homogeneiza a 65ºC/200 bar

4. La base de leche se pasteuriza a 95ºC durante 6minutos (P3)

5. La base de leche se enfría a 5ºC (K2) 25

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, Aria Foods Amba, Dinamarca)	93,533
Nata 38 % de grasa (Aria Foods Amba, Dinamarca)	1,067
Nutrilac YQ5075 (Aria Foods Ingredients, Dinamarca)	1,400
Lactosa (Variolac® 992 BG100, Aria Foods Amba, Dinamarca)	3,000
Enzima/H20	1,000
Total %	**100**

A continuación, la base de leche se calienta a 43ºC (K1). La dilución del cultivo YO-MIX 495 consistente en *Lactobacillus delbrüeckii 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 del 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, en la que una DCU es 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 43ºC, y después se interrumpió por enfriamiento rápido a 5ºC. 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 4ºC.

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 logrado con 5,5% (p/v) de lactosa inicial, como se muestra en la tabla 3. Se logra una concentración final de GOS de 2,954% con la dosis de 50 ppm de BIF917 ensayada, 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 yogur del blanco, en el que 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	Std.	Cantidad % p/v DP3+ (GOS)	Std.
Yogur	BIF917_12,5 ppm	3,295	0,224	1,525	0,197
	BIF917_25ppm	2,090	0,045	2,662	0,003
	BIF917_50ppm	1,395	0,090	2,954	0,202
	K. lactis β-Gal_25ppm	0,425	0,040	0,355	0,006
	H20	5,431	0,099	0,000	0,000
Base de leche	H20	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 YO-mix diferentes, todos consistentes en *Lactobacillus delbrüeckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (DuPont Nutrition Biosciences, Dinamarca): YO-MIX 495 con un tiempo de fermentación relativamente lento, YO-MIX 495 con un tiempo de fermentación relativamente rápido, y YO-MIX 601 con una fase de latencia prolongada y una fuerte fermentación acidificante. Todas las fermentaciones se realizaron a 43ºC con la misma cantidad de BIF917 (25 ppm).

Además de probar la influencia de la temperatura en el rendimiento de BIF917, se llevaron a cabo fermentaciones con YO-MIX 495 y 25 ppm de BIF917 a 43ºC, 45ºC y 47ºC.

Se aplicó el siguiente procedimiento para producir yogures al estilo balcánico con una concentración inicial de lactosa de 7,5% (p/v) (que corresponde a 7,1% p/p, como 1% p/v de lactosa = 0,9423% p/p en esta disolución):

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

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

3. La base de leche se homogeneiza a 65ºC / 200 bar

4. La base de leche se pasteuriza a 95ºC durante 6 minutos (P3)

5. La base de leche se enfría a 5ºC (K2)

6. La base de leche se calienta a 43ºC (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 de tapa azul de 250 ml, y se añadieron las enzimas en concentraciones variables que constituyeron el 1% (v/v) de la mezcla final de yogur.

8. El cultivo iniciador, ya sea YO-Mix 495, 485 o 601, se añadió en una dosis de 20 DCU (Unidades de Cultivo Danisco) por 100 litros. Para cada ensayo se obtuvieron tres muestras.

9. La fermentación se llevó a cabo a pH 4,6 a 43ºC (para estudios de temperatura a 43ºC, 45ºC y 47ºC respectivamente), y luego se detuvo por enfriamiento rápido a 5ºC.

10. La composición de azúcar/oligosacárido del yogur se analizó mediante HPLC el día después de la fermentación (véase el método de HPLC a continuación). Las muestras de yogur fermentado siempre se almacenaron a 4 ºC.

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, Aria Foods Amba, Dinamarca)	93,533
Nata 38 % de grasa (Aria Foods Amba, Dinamarca)	1,067
Nutrilac YQ5215 (Aria Foods Ingredients, Dinamarca)	1,400
Lactosa (Variolac® 992 BG100, Aria Foods Amba, Dinamarca)	3,000
Enzima/H20	1,000
Total %	**100**

Los resultados del experimento con yogur se muestran en la tabla 7. Puede verse que los diferentes cultivos YO-mix, que tienen diferentes perfiles de acidificación, no ejercen un efecto significativo sobre el rendimiento final de GOS. En promedio, se genera un 3,22% (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 varianza de cuantificación. El cambio en la temperatura de fermentación de 43ºC a 45ºC y 47ºC no cambia significativamente (usando 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 43ºC, 3,375% p/v a 45ºC y 3,236% p/v a 47ºC. Por lo tanto, se puede concluir que la acción de BIF917 en las condiciones investigadas es robusta para la generación in situ de GOS en yogur usando diversas condiciones de cultivo y temperatura.

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

Método HPLC

Todos los productos químicos usados fueron de grado analítico. D-(+)-lactosa (mín. 99%, nº 17814), D-(+)-glucosa (mín. 99,5%, sin G8270-100G, lote nº 036K0137) y D-(+)-galactosa (mín. 99%, sin G0750-25G, lote nº 031M0043V) se adquirieron de Sigma (St. Louis, Mo, EE. UU.). El jarabe Vivinal GOS (Prod. No 502675 Lote nº 649566) se obtuvo de Friesland Campina Domo (Amersfoort, Países Bajos) que contenía 57% de materia seca (DM) de galactooligosacáridos, 21% de DM de lactosa anhidra, 20% de DM de glucosa anhidra, y 0,8% en DM de galactosa anhidra.

Preparación de la muestra

Todos los patrones: lactosa, glucosa, galactosa y GOS se prepararon en agua bidestilada (ddH2O), y se filtraron a través de filtros de jeringa de 0,45 µm. Se preparó un conjunto de cada patrón con una concentración que oscilaba de 10 a 200000 ppm.

Para evaluar la cuantificación del conjunto de azúcares anterior en una matriz de yogur/leche, los patrones anteriores se añadieron a una muestra de leche y yogur como controles internos. Todas las muestras de leche y yogur que contenían β-gatactosidasa activa se inactivaron calentando la muestra a 95ºC durante 10 min. Todas las muestras de leche se prepararon en placas MTP de 96 pocillos (Corning, NY, EE. UU.), y se diluyeron un mínimo de 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 de PVDF, NY, EE. UU.). Las muestras que contenían más de 50000 ppm (5% p/v) de lactosa se calentaron a 30ºC para garantizar una solubilización adecuada. Todas las muestras de yogur se pesaron y diluyeron 10 veces en H2Odd antes de la homogeneización de la muestra usando un Ultra turrax TP18/10 af durante unos minutos (Janke & Kunkel Ika-labortechnik, Bie & Berntsen, Dinamarca). La β-gatactosidasa se inactivó mediante tratamiento térmico, y las muestras se diluyeron aún más en placas MTP de 96 pocillos filtradas a través de filtros de placa de 96 pocillos de 0,20 µm antes del análisis (placa de filtro Corning, membrana hidrófila de PVDF, NY, EE. UU.). Todas las muestras se analizaron en placas MTP de 96 pocillos selladas con cinta adhesiva.

Instrumentación

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

Condiciones cromatográficas

Las muestras se analizaron por HPLC usando una columna de oligosacáridos RSO, Ag^+ 4% reticulada (Phenomenex, Países Bajos) equipada con una precolumna analítica (Carbo-Ag^+ neutro, AJ0-4491, Phenomenex, Países Bajos) a 70ºC. La columna se eluyó con agua bidestilada (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.

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 30ºC en el compartimiento del automuestreador termostatizado, para asegurar la solubilización de la lactosa. El eluyente se monitorizó por medio de un detector de índice de refracción, y la cuantificación se realizó memdiante el área del pico con respecto 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, Países Bajos) se usaron como patrón para la cuantificación de GOS siguiendo la declaración del fabricante sobre el contenido de GOS en el producto.

LISTA DE SECUENCIAS

>SEQ ID NO: 1 (BIF_917)

vedatrsdsttqmsstpevvyssavdskqnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvt
stitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvlvveevfdmwnrsknqntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdtyyfyqsqwnddvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyft
pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaakl
kadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeage
itvtakadglqsstvkiattavpgtstekt

>SEQ ID NO: 2 (BIF_995)

vedatrsdsttqmsstpevvyssavdskqnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvt
stitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvlvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdtyyfyqsqwnddvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyft
pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaakl
kadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeage

itvtakadglqsstvkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakagsfsvagt
vagqkisvrvtmideigal

>SEQ ID NO: 3 (BIF_1068)

Vedatrsdsttqmsstpevvyssavdskqnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvt
stitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvlvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdtyyfyqsqwnddvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyft
pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaakl
kadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeage
itvtakadglqsstvkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakagsfsvagt
vagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfavhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtat
irvq

>SEQ ID NO: 4 (BIF_1172)

vedatrsdsttqmsstpevvyssavdskqnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvt
stitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvlvveevfdmwnrsknqntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdtyyfyqsqwnddvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyft
pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaakl
kadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeage
itvtakadglqsstvkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakagsfsvagt
vagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfavhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtat
irvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivm
yffrdsnavrfpdagktkiqi

>SEQ ID NO: 5 (BIF_1241)

vedatrsdsttqmsstpevvyssavdskqnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvt
stitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvlvveevfdmwnrsknqntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdtyyfyqsqwnddvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyft
pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaakl
kadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeage
itvtakadglqsstvkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakagsfsvagt
vagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfavhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtat
irvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivm
yffrdsnavrfpdagktkiqisadgknwtdlaatetiaaqessdrvkpytydfapvgatfvkvtvtnadtttpsgvvcaglteielktat

>SEQ ID NO: 6 (BIF_1326)

vedatrsdsttqmsstpevvyssavdskqnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvt
stitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvlvveevfdmwnrsknqntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdtyyfyqsqwnddvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyft
pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaakl
kadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeage
itvtakadglqsstvkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakagsfsvagt
vagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfavhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtat
irvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivm
yffrdsnavrfpdagktkiqisadgknwtdlaatetiaaqessdrvkpytydfapvgatfvkvtvtnadtttpsgvvcaglteielktat
skfvtntsaalssltvngtkvsdsvlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtvlpahdnvirvitesedhvtrktftinlgteqef

>SEQ ID NO: 7 Núcleo catalítico de glucósido hidrolasa de Bifidobacterium bifidum

qnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgv
ymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgiyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatq
nggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvtstitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
vldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveilqkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvl
vveevfdmwnrsknqntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdrnapsvimwslgnemmegisgsvsgfp
atsaklvawtkaadstrpmty

>SEQ ID NO: 8 secuencia nucleotídica que codifica la longitud completa

gcagttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcgatagcaa
acaaaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattca
gcatggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccg
ggaggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctat
atgaatgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgca
aaatttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttataga
gatgttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggc
ggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttcc
gaaaggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttaca
agcacaattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggagg
caaagttctggatacatatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttcactgaatggcgaaaaa
gtcaaactgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcga
aatcctgcaaaaaatgggcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaag
gcgttctggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaag
caattgcaggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgata
gaaatgcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatc
agcaaaactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaa
cgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaattattcagatggcgcaaactatgataaaat
tcgtacaacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacagg
cggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatga
tgttgttcagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggc
tcaggcgcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttt
tatcagagccagtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaata
atgttccggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcg
aaaaatcatttacaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataa
aaacatgtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgcctgattccgga
aggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaatta
cagcggatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtca
catttgatgttaaaggcgcaggcaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaa
agcattttcaggcaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgc
aatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaac
tattatgtcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagacaaaacgtt
acatgggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttc
gcgtcacaatgattgatgaaattggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccgggatcaag
accggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtccattggacaaaaccggcagatacagtctataatacagc
aggcacagtcaaagtaccgggaacagcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagccaa
gttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgcg
attaaagatggctcaacaacagttgatgcaaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagc

aggccataacacagcggaaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactgggccagatcgtcatgtatttttttcgcgatagcaat
gcagttagatttccggatgctggcaaaacaaaaattcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcagcaacagaaa
caattgcagcgcaagaatcaagcgatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccggttggcgcaacatttgttaaagtgacagt
cacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcgttgtttgcgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgacaagcaaattt
gtcacaaatacatcagcagcactgtcatcacttacagtcaatggcacaaaagtttcagattcagttctggcagcaggctcatataaca
caccggcaattatcgcagatgttaaagcggaaggcgaaggcaatgcaagcgttacagtccttccggcacatgataatgttattcgcg
tcattacagaaagcgaagatcatgtcacacgcaaaacatttacaatcaacctgggcacagaacaagaatttccggctgattcagatg
aaagagattatccggcagcagatatgacagtcacagttggctcagaacaaacatcaggcacagcaacagaaggaccgaaaaaat
ttgcagtcgatggcaacacatcaacatattggcatagcaattggacaccgacaacagttaatgatctgtggatcgcgtttgaactgca
aaaaccgacaaaactggatgcactgagatatcttccgcgtccggcaggctcaaaaaatggcagcgtcacagaatataaagttcagg
tgtcagatgatggaacaaactggacagatgcaggctcaggcacatggacaacggattatggctggaaactggcggaatttaatca
accggtcacaacaaaacatgttagactgaaagcggttcatacatatgcagatagcggcaacgataaatttatgagcgcaagcgaaa
ttagactgagaaaagcggtcgatacaacggatatttcaggcgcaacagttacagttccggcaaaactgacagttgatagagttgatg
cagatcatccggcaacatttgcaacaaaagatgtcacagttacactgggagatgcaacactgagatatggcgttgattatctgctgg
attatgcaggcaatacagcagttggcaaagcaacagtgacagttagaggcattgataaatattcaggcacagtcgcgaaaacattt
acaattgaactgaaaaatgcaccggcaccggaaccgacactgacatcagttagcgtcaaaacaaaaccgagcaaactgacatatg
ttgtcggagatgcatttgatccggcaggcctggttctgcaacatgatagacaagcagatagacctccgcaaccgctggttggcgaac
aagcggatgaacgcggactgacatgcggcacaagatgcgatagagttgaacaactgcgcaaacatgaaaatagagaagcgcata
gaacaggcctggatcatctggaatttgttggcgcagcagatggcgcagttggagaacaagcaacatttaaagtccatgtccatgcag
atcagggagatggcagacatgatgatgcagatgaacgcgatattgatccgcatgttccggtcgatcatgcagttggcgaactggca
agagcagcatgccatcatgttattggcctgagagtcgatacacatagacttaaagcaagcggctttcaaattccggctgatgatatgg
cagaaatcgatcgcattacaggctttcatcgttttgaacgccatgtc

>SEQ ID NO: 9 secuencia nucleotídica que codifica BIF_917

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcgatagcaaaca
aaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaa
gttctggatacatatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttcactgaatggcgaaaaagtcaa
actgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcct
gcaaaaaatgggcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttc
tggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattg

caggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaat
gcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaa
aactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacgaatc
aaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaattattcagatggcgcaaactatgataaaattcgtac
aacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcggagc
acaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatgttgtt
cagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggc
gcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttttatcag
agccagtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataatgttcc
ggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaat
catttacaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaacat
gtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgcctgattccggaaggca
gcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcg
gatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttg
atgttaaaggcgcaggcaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcat
tttcaggcaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatca
agcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaaca

>SEQ ID NO: 10 secuencia nucleotídica que codifica BIF_995

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcgatagcaaaca
aaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaa
gttctggatacatatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttcactgaatggcgaaaaagtcaa
actgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcct
gcaaaaaatgggcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttc
tggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattg
caggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaat
gcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaa
aactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacgaatc
aaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaattattcagatggcgcaaactatgataaaattcgtac
aacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcggagc

acaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatgttgtt
cagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggc
gcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttttatcag
agccagtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataatgttcc
ggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaat
catttacaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaacat
gtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgcctgattccggaaggca
gcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcg
gatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttg
atgttaaaggcgcaggcaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcat
tttcaggcaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatca
agcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaactattat
gtcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagacaaaacgttacatg
ggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtc
acaatgattgatgaaattggcgcactg

>SEQ ID NO: 11 secuencia nucleotídica que codifica BIF_1068

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcgatagcaaaca
aaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaa
gttctggatacatatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttcactgaatggcgaaaaagtcaa
actgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcct
gcaaaaaatgggcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttc
tggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattg
caggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaat
gcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaa
aactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacgaatc
aaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaattattcagatggcgcaaactatgataaaattcgtac
aacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcggagc
acaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatgttgtt
cagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggc

gcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttttatcag
agccagtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataatgttcc
ggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaat
catttacaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaacat
gtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgcctgattccggaaggca
gcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcg
gatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttg
atgttaaaggcgcaggcaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcat
tttcaggcaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatca
agcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaactattat
gtcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagacaaaacgttacatg
ggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtc
acaatgattgatgaaattggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccgggatcaagaccg
gcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtccattggacaaaaccggcagatacagtctataatacagcaggc
acagtcaaagtaccgggaacagcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaa

>SEQ ID NO: 12 secuencia nucleotídica que codifica BIF_1172

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcgatagcaaaca
aaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaa
gttctggatacatatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttcactgaatggcgaaaaagtcaa
actgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcct
gcaaaaaatgggcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttc
tggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattg
caggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaat
gcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaa
aactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacgaatc
aaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaattattcagatggcgcaaactatgataaaattcgtac
aacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcggagc
acaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatgttgtt
cagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggc

gcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttttatcag
agccagtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataatgttcc
ggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaat
catttacaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaacat
gtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgcctgattccggaaggca
gcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcg
gatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttg
atgttaaaggcgcaggcaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcat
tttcaggcaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatca
agcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaactattat
gtcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagacaaaacgttacatg
ggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtc
acaatgattgatgaaattggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccgggatcaagaccg
gcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtccattggacaaaaccggcagatacagtctataatacagcaggc
acagtcaaagtaccgggaacagcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagccaagttac
aattggctcatcagtttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgcgattaa
agatggctcaacaacagttgatgcaaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagcaggc
cataacacagcggaaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactgggccagatcgtcatgtatttttttcgcgatagcaatgcag
ttagatttccggatgctggcaaaacaaaaattcagatc

>SEQ ID NO: 13 secuencia nucleotídica que codifica BIF_1241

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcgatagcaaaca
aaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaa
gttctggatacatatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttcactgaatggcgaaaaagtcaa
actgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcct
gcaaaaaatgggcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttc
tggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattg
caggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaat
gcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaa
aactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacgaatc

aaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaattattcagatggcgcaaactatgataaaattcgtac
aacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcggagc
acaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatgttgtt
cagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggc
gcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttttatcag
agccagtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataatgttcc
ggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaat
catttacaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaacat
gtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgcctgattccggaaggca
gcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcg
gatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttg
atgttaaaggcgcaggcaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcat
tttcaggcaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatca
agcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaactattat
gtcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagacaaaacgttacatg
ggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtc
acaatgattgatgaaattggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccgggatcaagaccg
gcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtccattggacaaaaccggcagatacagtctataatacagcaggc
acagtcaaagtaccgggaacagcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagccaagttac
aattggctcatcagtttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgcgattaa
agatggctcaacaacagttgatgcaaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagcaggc
cataacacagcggaaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactgggccagatcgtcatgtatttttttcgcgatagcaatgcag
ttagatttccggatgctggcaaaacaaaaattcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcagcaacagaaacaatt
gcagcgcaagaatcaagcgatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccggttggcgcaacatttgttaaagtgacagtcaca
aacgcagatacaacaacaccgtcaggcgttgtttgcgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgaca

>SEQ ID NO: 14 secuencia nucleotídica que codifica BIF_1326

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaagttgtttattcatcagcggtcgatagcaaaca
aaatcgcacaagcgattttgatgcgaactggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcagca
tggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagcaatgaagcagaatcagcatatcttccggga
ggcacaggctggtatagaaaaagctttacaattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccgttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaat
ttggcggagaaaacacaattgtcgtcaaagttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaacaccgtcactggcaacacaaaatggcggag
atgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgcgaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaa
ggcggaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggcgcatcagcagatgttacaagca
caattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaaaaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaa
gttctggatacatatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttcactgaatggcgaaaaagtcaa

actgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcacttggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcct
gcaaaaaatgggcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgcaatgaaaaaggcgttc
tggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattg
caggcgataatgcagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaaccgcgatagaaat
gcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaaggcatttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaa
aactggttgcatggacaaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactggaacgaatc
aaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaattattcagatggcgcaaactatgataaaattcgtac
aacacatccgtcatgggcaatttatggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggcggagc
acaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctggggagcagttgcatcatcagcatggtatgatgttgtt
cagagagattttgtcgcaggcacatatgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgacaccgtggaatggcacaggctcaggc
gcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagcaggctttccgaaagatacatattatttttatcag
agccagtggaatgatgatgttcatacactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataatgttcc
ggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaaggctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaat
catttacaaaaaaaacaacagcggcaggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaacat
gtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatgaaaataatcgcctgattccggaaggca
gcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacaggcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcg
gatggcaaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgcagcaaatagagtcacatttg
atgttaaaggcgcaggcaaactggttggcgttgataatggctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcat
tttcaggcaaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagcagatggcctgcaatca
agcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagcacagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaactattat
gtcaaaacaggcaacaaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagacaaaacgttacatg
ggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtc
acaatgattgatgaaattggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccgggatcaagaccg
gcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtccattggacaaaaccggcagatacagtctataatacagcaggc
acagtcaaagtaccgggaacagcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagccaagttac
aattggctcatcagtttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccggcagataaacaatcagatacactggatgcgattaa
agatggctcaacaacagttgatgcaaatacaggcggaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagcaggc
cataacacagcggaaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactgggccagatcgtcatgtattttttttcgcgatagcaatgcag
ttagatttccggatgctggcaaaacaaaaattcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcagcaacagaaacaatt
gcagcgcaagaatcaagcgatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccggttggcgcaacatttgttaaagtgacagtcaca
aacgcagatacaacaacaccgtcaggcgttgtttgcgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgacaagcaaatttgtcac
aaatacatcagcagcactgtcatcacttacagtcaatggcacaaaagtttcagattcagttctggcagcaggctcatataacacaccg
gcaattatcgcagatgttaaagcggaaggcgaaggcaatgcaagcgttacagtccttccggcacatgataatgttattcgcgtcatta
cagaaagcgaagatcatgtcacacgcaaaacatttacaatcaacctgggcacagaacaagaattt

>SEQ ID NO: 15 cebador directo para la generación de variantes de BIF

GGGGTAACTAGTGGAAGATGCAACAAGAAG

>SEQ ID NO: 16 cebador inverso para BIF917

GCGCTTAATTAATTATGTTTTTTCTGTGCTTGTTC

>SEQ ID NO: 17 cebador inverso para BIF995

GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTTCATCAATCA

>SEQ ID NO: 18 cebador inverso para BIF1068

GCGCTTAATTAATTATTGAACTCTAATTGTCGCTG

>SEQ ID NO: 19 cebador inverso para BIF1241

GCGCTTAATTAATTATGTCGCTGTTTTCAGTTCAAT

>SEQ ID NO: 20 cebador inverso para BIF1326

GCGCTTAATTAATTAAAATTCTTGTTCTGTGCCCA

>SEQ ID NO: 21 cebador inverso para BIF1478

GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTTCGCTTGCGC

>SEQ ID NO: 22 Bifidobacterium bifidum BIF1750

vedatrsdsttqmsstpevvyssavdskqnrtsdfdanwkfmlsdsvqaqdpafddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesa
ylpggtgwyrksftidrdlagkriainfdgvymnatvwfngvklgthpygyspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsg
iyrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvfpkggktdaaigtvttasksiaagasadvt
stitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggkvldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekgvlvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiagdnavlggdkdetwakfdltstinrdr
napsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklvawtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdga
nydkirtthpswaiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfvagtyvwtgfdylgept
pwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdtyyfyqsqwnddvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyft
pkgstekrligeksftkkttaagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasvtttgkaakl
kadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvgvdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeage
itvtakadglqsstvkiattavpgtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakagsfsvagt
vagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanfavhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtat
irvqrsqvtigssvsgnalrltqnipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqqlgqivm
yffrdsnavrfpdagktkiqisadgknwtdlaatetiaaqessdrvkpytydfapvgatfvkvtvtnadtttpsgvvcaglteielktat
skfvtntsaalssltvngtkvsdsvlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtvlpahdnvirvitesedhvtrktftinlgteqefpadsd
erdypaadmtvtvgseqtsgtategpkkfavdgntstywhsnwtpttvndlwiafelqkptkldalrylprpagskngsvteykvq
vsddgtnwtdagsgtwttdygwklaefnqpvttkhvrlkavhtyadsgndkfmsaseirlrkavdttdisgatvtvpakltvdrvda
dhpatfatkdvtvtlgdatlrygvdylldyagntavgkatvtvrgidkysgtvaktftielknapapeptltsvsvktkpskltyvvgda

fdpaglvlqhdrqadrppqplvgeqadergltcgtrcdrveqlrkhenreahrtgldhlefvgaadgavgeqatfkvhvhadqgdgr
hddaderdidphvpvdhavgelaraachhviglrvdthrlkasgfqipaddmaeidritgfhrferhvg

>SEQ ID NO: 23 La secuencia señal de lactasa extracelular de Bifidobacterium bifidum DSM20215

Vrskklwisllfalaliftmafgstssaqa

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DuPont Nutrition BioSciences ApS
<120> POLIPÉPTIDOS QUE TIENEN ACTIVIDAD TRANSGALACTOSILANTE
<130> NB40269WOPCT
<160> 23
<170> BiSSAP 1.0
<210> 1
<211> 887
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..887
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"

<400> 1

```
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
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..965
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<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                 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 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
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..1038
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<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
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 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
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..1142
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<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 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 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
            1140
```

<210> 5
<211> 1211
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>

<221> FUENTE
<222> 1..1211
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<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 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 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
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..1296
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<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
```

```
    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 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 Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe
                1285                1290                1295
```

<210> 7
<211> 453
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..453
<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
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> fuente
<222> 1..5160
<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<400> 8

```
gcagttgaag atgcaacaag aagcgatagc acaacacaaa tgtcatcaac accggaagtt        60

gtttattcat cagcggtcga tagcaaacaa aatcgcacaa gcgattttga tgcgaactgg       120

aaatttatgc tgtcagatag cgttcaagca caagatccgg catttgatga ttcagcatgg       180

caacaagttg atctgccgca tgattatagc atcacacaga aatatagcca aagcaatgaa       240

gcagaatcag catatcttcc gggaggcaca ggctggtata gaaaaagctt tacaattgat       300

agagatctgg caggcaaacg cattgcgatt aattttgatg gcgtctatat gaatgcaaca       360
```

gtctggttta atggcgttaa 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 caggcgcatc agcagatgtt 780

acaagcacaa ttacagcagc aagcccgaaa ctgtggtcaa ttaaaaaccc gaacctgtat 840

acagttagaa cagaagttct gaacggaggc aaagttctgg atacatatga tacagaatat 900

ggctttcgct ggacaggctt tgatgcaaca tcaggctttt cactgaatgg cgaaaaagtc 960

aaactgaaag gcgttagcat gcatcatgat caaggctcac ttggcgcagt tgcaaataga 1020

cgcgcaattg aaagacaagt cgaaatcctg caaaaaatgg gcgtcaatag cattcgcaca 1080

acacataatc cggcagcaaa agcactgatt gatgtctgca atgaaaaagg cgttctggtt 1140

gtcgaagaag tctttgatat gtggaaccgc agcaaaaatg gcaacacgga agattatggc 1200

aaatggtttg gccaagcaat tgcaggcgat aatgcagttc tgggaggcga taaagatgaa 1260

acatgggcga aatttgatct tacatcaaca attaaccgcg atagaaatgc accgtcagtt 1320

attatgtggt cactgggcaa tgaaatgatg gaaggcattt caggctcagt ttcaggcttt 1380

ccggcaacat cagcaaaact ggttgcatgg acaaaagcag cagattcaac aagaccgatg 1440

acatatggcg ataacaaaat taaagcgaac tggaacgaat caaatacaat gggcgataat 1500

ctgacagcaa atggcggagt tgttggcaca aattattcag atggcgcaaa ctatgataaa 1560

attcgtacaa cacatccgtc atgggcaatt tatggctcag aaacagcatc agcgattaat 1620

agccgtggca tttataatag aacaacaggc ggagcacaat catcagataa acagctgaca 1680

agctatgata attcagcagt tggctgggga gcagttgcat catcagcatg gtatgatgtt 1740

gttcagagag attttgtcgc aggcacatat gtttggacag gatttgatta tctgggcgaa 1800

ccgacaccgt ggaatggcac aggctcaggc gcagttggct catggccgtc accgaaaaat 1860

agctattttg gcatcgttga tacagcaggc tttccgaaag atacatatta tttttatcag 1920

agccagtgga atgatgatgt tcatacactg catattcttc cggcatggaa tgaaaatgtt 1980

gttgcaaaag gctcaggcaa taatgttccg gttgtcgttt atacagatgc agcgaaagtg 2040

aaactgtatt ttacaccgaa aggctcaaca gaaaaaagac tgatcggcga aaaatcattt 2100

acaaaaaaaa caacagcggc aggctataca tatcaagtct atgaaggcag cgataaagat 2160

tcaacagcgc ataaaaacat gtatctgaca tggaatgttc cgtgggcaga aggcacaatt 2220

tcagcggaag cgtatgatga aaataatcgc ctgattccgg aaggcagcac agaaggcaac 2280

gcatcagtta caacaacagg caaagcagca aaactgaaag cagatgcgga tcgcaaaaca 2340

attacagcgg atggcaaaga tctgtcatat attgaagtcg atgtcacaga tgcaaatggc 2400

catattgttc cggatgcagc aaatagagtc acatttgatg ttaaaggcgc aggcaaactg 2460

gttggcgttg ataatggctc atcaccggat catgattcat atcaagcgga taaccgcaaa 2520

gcattttcag gcaaagtcct ggcaattgtt cagtcaacaa aagaagcagg cgaaattaca 2580

gttacagcaa aagcagatgg cctgcaatca agcacagtta aaattgcaac aacagcagtt 2640

ccgggaacaa gcacagaaaa aacagtccgc agcttttatt 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

cttccgggat 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 aaatccgtca 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

acatttgtta aagtgacagt cacaaacgca gatacaacaa caccgtcagg cgttgtttgc 3600

gcaggcctga cagaaattga actgaaaaca gcgacaagca aatttgtcac aaatacatca 3660

gcagcactgt catcacttac agtcaatggc acaaaagttt 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 tttgcagtcg atggcaacac atcaacatat 4020

tggcatagca attggacacc gacaacagtt aatgatctgt ggatcgcgtt tgaactgcaa 4080

aaaccgacaa aactggatgc actgagatat cttccgcgtc cggcaggctc aaaaaatggc 4140

agcgtcacag aatataaagt tcaggtgtca gatgatggaa caaactggac agatgcaggc 4200

tcaggcacat ggacaacgga ttatggctgg aaactggcgg aatttaatca 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 acatttacaa ttgaactgaa aaatgcaccg 4620

gcaccggaac cgacactgac atcagttagc gtcaaaacaa aaccgagcaa actgacatat 4680

gttgtcggag atgcatttga tccggcaggc ctggttctgc aacatgatag acaagcagat 4740

agacctccgc aaccgctggt tggcgaacaa gcggatgaac gcggactgac atgcggcaca 4800

agatgcgata gagttgaaca actgcgcaaa catgaaaata gagaagcgca tagaacaggc 4860

ctggatcatc tggaatttgt tggcgcagca gatggcgcag ttggagaaca agcaacattt 4920

aaagtccatg tccatgcaga tcagggagat ggcagacatg atgatgcaga tgaacgcgat 4980

attgatccgc atgttccggt cgatcatgca gttggcgaac tggcaagagc agcatgccat 5040

catgttattg gcctgagagt cgatacacat agacttaaag caagcggctt tcaaattccg 5100

gctgatgata tggcagaaat cgatcgcatt acaggctttc atcgttttga acgccatgtc 5160

<210> 9
<211> 2661
<212> ADN
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> fuente
<222> 1..2661
<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<400> 9

gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttgtt 60

tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa 120

tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacaa 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 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 tggtcaatta 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 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 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 ctcaggcgca 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

aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160

acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220

gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcctg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280

tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340

acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg 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 a 2661

<210> 10

<211> 2895
<212> ADN
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> fuente
<222> 1..2895
<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<400> 10

gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttgtt 60

tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa 120

tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacaa 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 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 tggtcaatta 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 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 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 ctcaggcgca 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

aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160

acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220

gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcctg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280

tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340

acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg 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 tggaacaagc 2760

gatagacaaa acgttacatg ggatgcagtt tcagatgatc aaattgcaaa agcaggctca 2820

ttttcagttg caggcacagt tgcaggccaa aaaattagcg ttcgcgtcac aatgattgat 2880

gaaattggcg cactg 2895

<210> 11
<211> 3114
<212> ADN
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> fuente
<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 tcaagcacaa 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 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 tggtcaatta 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 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 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 ctcaggcgca 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

aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160

acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220

gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcctg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280

tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340

acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg 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 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
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> fuente
<222> 1..3426
<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<400> 12

```
gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttgtt       60
tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa      120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacaa 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 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 tggtcaatta 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 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 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 ctcaggcgca 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

aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca     2160

acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca     2220

gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcctg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca     2280

tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt     2340

acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg 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 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 tcaaagaagc     3120

caagttacaa ttggctcatc agtttcagga aatgcactga gactgacaca aaatattccg     3180

gcagataaac aatcagatac actggatgcg attaaagatg gctcaacaac agttgatgca     3240

aatacaggcg gaggcgcaaa tccgtcagca tggacaaatt gggcatattc aaaagcaggc     3300

cataacacag cggaaattac atttgaatat gcgacagaac aacaactggg ccagatcgtc     3360

atgtattttt ttcgcgatag caatgcagtt agatttccgg atgctggcaa aacaaaaatt     3420

cagatc                                                               3426
```

<210> 13
<211> 3633
<212> ADN
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> fuente
<222> 1..3633
<223> /tipo de molécula="ADN" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<400> 13

gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttgtt 60

tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa 120

tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacaa 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 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 tggtcaatta 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 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 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 ctcaggcgca 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

aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160

acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220

gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcctg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280

tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340

acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg 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 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 tcaaagaagc 3120

caagttacaa ttggctcatc agtttcagga aatgcactga gactgacaca aaatattccg 3180

gcagataaac aatcagatac actggatgcg attaaagatg gctcaacaac agttgatgca 3240

aatacaggcg gaggcgcaaa tccgtcagca tggacaaatt gggcatattc aaaagcaggc 3300

cataacacag cggaaattac atttgaatat gcgacagaac aacaactggg ccagatcgtc 3360

atgtattttt ttcgcgatag caatgcagtt agatttccgg atgctggcaa aacaaaaatt 3420

cagatcagcg cagatggcaa aaattggaca gatctggcag caacagaaac aattgcagcg 3480

caagaatcaa gcgatagagt caaaccgtat acatatgatt ttgcaccggt 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"
<400> 14

```
gttgaagatg caacaagaag cgatagcaca acacaaatgt catcaacacc ggaagttgtt       60
tattcatcag cggtcgatag caaacaaaat cgcacaagcg attttgatgc gaactggaaa      120
tttatgctgt cagatagcgt tcaagcacaa 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 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 tggtcaatta 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 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 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 ctcaggcgca 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

aaaaaaacaa cagcggcagg ctatacatat caagtctatg aaggcagcga taaagattca 2160

acagcgcata aaaacatgta tctgacatgg aatgttccgt gggcagaagg cacaatttca 2220

gcggaagcgt atgatgaaaa taatcgcctg attccggaag gcagcacaga aggcaacgca 2280

tcagttacaa caacaggcaa agcagcaaaa ctgaaagcag atgcggatcg caaaacaatt 2340

acagcggatg gcaaagatct gtcatatatt gaagtcgatg 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 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 tcaaagaagc 3120

caagttacaa ttggctcatc agtttcagga aatgcactga gactgacaca aaatattccg 3180

gcagataaac aatcagatac actggatgcg attaaagatg gctcaacaac agttgatgca 3240

aatacaggcg gaggcgcaaa tccgtcagca tggacaaatt gggcatattc aaaagcaggc 3300

cataacacag cggaaattac atttgaatat gcgacagaac aacaactggg ccagatcgtc 3360

atgtattttt ttcgcgatag caatgcagtt agatttccgg atgctggcaa aacaaaaatt 3420

cagatcagcg cagatggcaa aaattggaca gatctggcag caacagaaac aattgcagcg 3480

caagaatcaa gcgatagagt caaaccgtat acatatgatt ttgcaccggt tggcgcaaca 3540

tttgttaaag tgacagtcac aaacgcagat acaacaacac cgtcaggcgt tgtttgcgca 3600

ggcctgacag aaattgaact gaaaacagcg acaagcaaat ttgtcacaaa tacatcagca 3660

gcactgtcat cacttacagt caatggcaca aaagtttcag attcagttct ggcagcaggc 3720

tcatataaca caccggcaat tatcgcagat gttaaagcgg aaggcgaagg caatgcaagc 3780

gttacagtcc ttccggcaca tgataatgtt attcgcgtca ttacagaaag cgaagatcat 3840

gtcacacgca aaacatttac aatcaacctg ggcacagaac aagaattt 3888

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..30
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 15
ggggtaacta gtggaagatg caacaagaag 30
<210> 16
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 16
gcgcttaatt aattatgttt tttctgtgct tgttc 35
<210> 17
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..38
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 17

gcgcttaatt aattacagtg cgccaatttc atcaatca 38

<210> 18
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 18
gcgcttaatt aattattgaa ctctaattgt cgctg 35
<210> 19
<211> 36
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..36
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="secuencias artificiales"
<400> 19

gcgcttaatt aattatgtcg ctgttttcag ttcaat 36
<210> 20
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="artificial sequences"
<400> 20
gcgcttaatt aattaaaatt cttgttctgt gccca 35
<210> 21
<211> 38
<212> ADN
<213> secuencias artificiales
<220>
<221> fuente
<222> 1..38
<223> /tipo de molécula="ADN" /nota="Cebador de ADN sintético" /organismo="artificial sequences"
<400> 21

gcgcttaatt aattatctca gtctaatttc gcttgcgc 38

<210> 22
<211> 1720
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..1720
<223> /tipo de molécula="proteína" /organismo="Bifidobacterium bifidum"
<400> 22

```
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 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 Arg Lys Thr Phe Thr Ile Asn Leu Gly Thr Glu Gln Glu Phe
                1285                1290                1295
Pro Ala Asp Ser Asp Glu Arg Asp Tyr Pro Ala Ala Asp Met Thr Val
            1300                1305                1310
Thr Val Gly Ser Glu Gln Thr Ser Gly Thr Ala Thr Glu Gly Pro Lys
        1315                1320                1325
Lys Phe Ala Val Asp Gly Asn Thr Ser Thr Tyr Trp His Ser Asn Trp
    1330                1335                1340
Thr Pro Thr Thr Val Asn Asp Leu Trp Ile Ala Phe Glu Leu Gln Lys
1345                1350                1355                1360
Pro Thr Lys Leu Asp Ala Leu Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Gly Ser
                1365                1370                1375
Lys Asn Gly Ser Val Thr Glu Tyr Lys Val Gln Val Ser Asp Asp Gly
            1380                1385                1390
```

```
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
<213> Bifidobacterium bifidum
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..30
<223> /tipo de molécula="proteína" /nota="Secuencia señal de lactasa extracelular procedente 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 que consiste en:

a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1,

b. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2,

c. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3,

en el que la longitud del polipéptido es 500 a 1038 restos de aminoácidos.

2. El polipéptido según la reivindicación 1, en el que la identidad de secuencia del polipéptido es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

3. El polipéptido según la reivindicación 2, en el que la identidad de secuencia del polipéptido es al menos 98% con cualquiera de SEQ ID NO: 1 o 2.

4. El polipéptido según la reivindicación 2, en el que la identidad de secuencia del polipéptido es al menos 99% con cualquiera de SEQ ID NO: 1 o 2.

5. El polipéptido según la reivindicación 3, en el que el polipéptido consiste en como máximo 975, 970, 950, 940, 930, 920, 910, 900, 895 u 890 restos de aminoácidos.

6. El polipéptido según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

7. El polipéptido según cualquier reivindicación anterior, en el que la identidad de la secuencia polipeptídica es al menos 98% con SEQ ID NO: 1, y en el que dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácidos.

8. El polipéptido según la reivindicación 7, en el que el polipéptido consiste en como máximo 950 restos de aminoácidos.

9. El polipéptido según la reivindicación 7, en el que el polipéptido consiste en como máximo 890 restos de aminoácidos.

10. El polipéptido según la reivindicación 7, en el que el polipéptido consiste en como máximo 887 restos de aminoácidos.

11. El polipéptido según cualquier reivindicación anterior, en el que la identidad de la secuencia polipeptídica es al menos 98% con SEQ ID NO: 2, y en el que dicho polipéptido consiste en como máximo 975 restos de aminoácidos.

12. El polipéptido según la reivindicación 11, en el que el polipéptido consiste en como máximo 965 restos de aminoácidos.

13. El polipéptido según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido:

(i) deriva de *Bifidobacterium bifidum*;

(ii) contiene un núcleo catalítico de glucósido hidrolasa que pertenece a la familia GH-2; y/o

(iii) es un polipéptido variante con termoestabilidad mejorada.

14. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido tiene una relación de actividad de transgalactosilación por encima de 100%, preferiblemente por encima de 150%, 175% o 200%, en el que dicha actividad transgalactosilante se calcula como la relación entre Abs420 con aceptor presente dividida entre Abs420 sin aceptor presente, por 100.

15. El polipéptido según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido tiene una relación de actividad transgalactosilante:actividad de β-galactosidasa de al menos 1,5, o al menos 2, después de 30 minutos de reacción.

16. El polipéptido según la reivindicación 14, en el que el polipéptido tiene una relación de actividad transgalactosilante:actividad de β-galactosidasa de al menos 2 a una concentración de lactosa inicial del 3% p/p o superior.

17. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

18. Un vector de expresión y/o un plásmido que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 17, para expresar un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

19. Una célula capaz de expresar un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la célula comprende un plásmido o vector de expresión según la reivindicación 18.

20. Un método para expresar un polipéptido, comprendiendo el método obtener una célula según la reivindicación 19, y expresar el polipéptido de la célula, y opcionalmente purificar el polipéptido.

21. Una composición que comprende un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que preferiblemente la composición es una composición alimentaria.

22. Un método para producir un producto alimentario mediante el tratamiento de un sustrato a base de leche que comprende lactosa con un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que el sustrato a base de leche es cualquier material de leche cruda y/o procesada.

23. Un procedimiento para producir galactooligosacáridos, que comprende poner en contacto un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o una célula de la reivindicación 19, con una disolución a base de leche que comprende lactosa.

24. Uso del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o una célula de la reivindicación 19, para producir galactooligosacáridos.

Figura 1

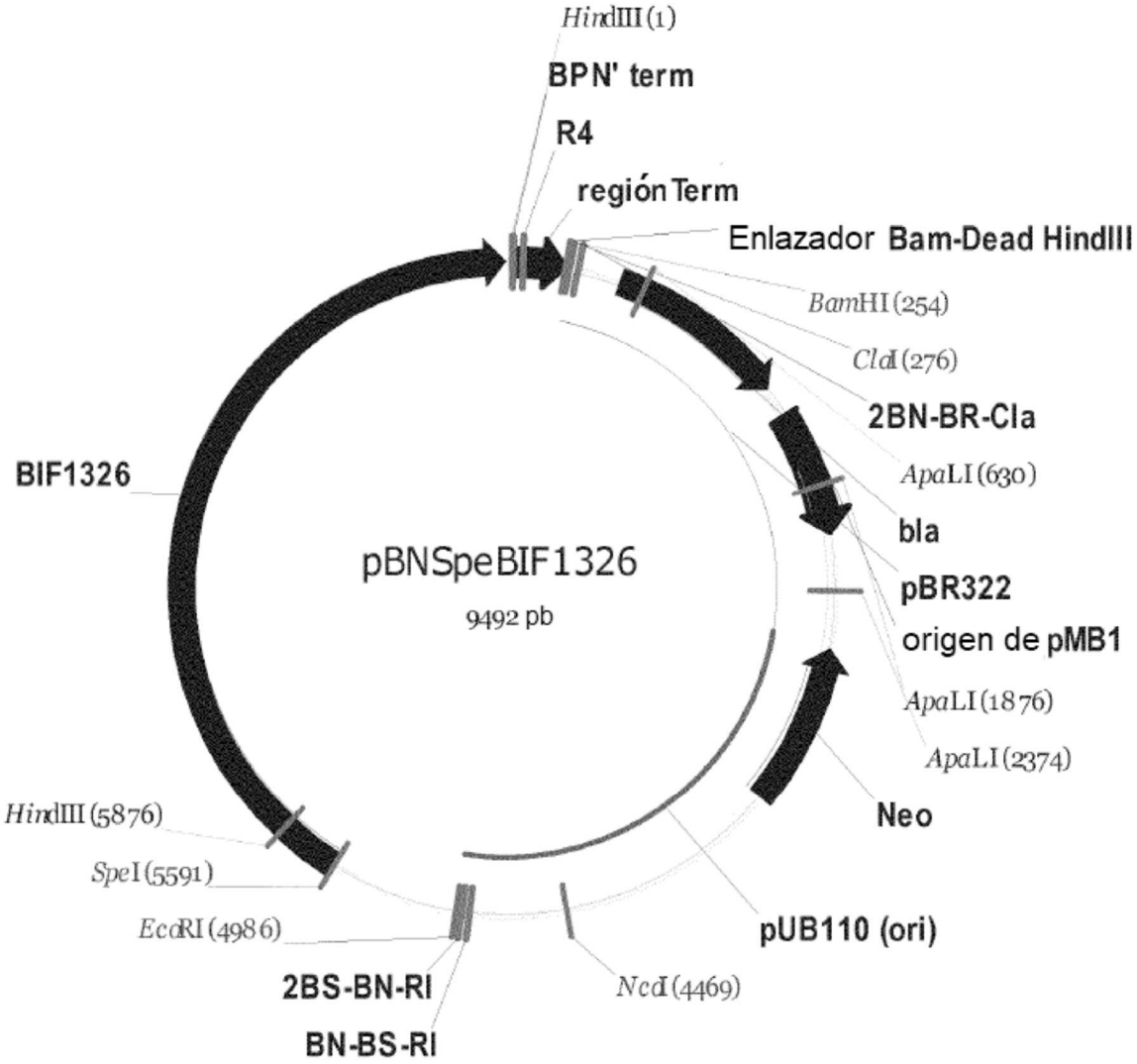

HindIII (1)
BPN' term
R4
región Term
Enlazador Bam-Dead HindIII
BamHI (254)
ClaI (276)
2BN-BR-Cla
ApaLI (630)
bla
pBR322
origen de pMB1
ApaLI (1876)
ApaLI (2374)
Neo
pUB110 (ori)
NcoI (4469)
2BS-BN-RI
BN-BS-RI
EcoRI (4986)
SpeI (5591)
HindIII (5876)
BIF1326
pBNSpeBIF1326
9492 pb

Figura 2

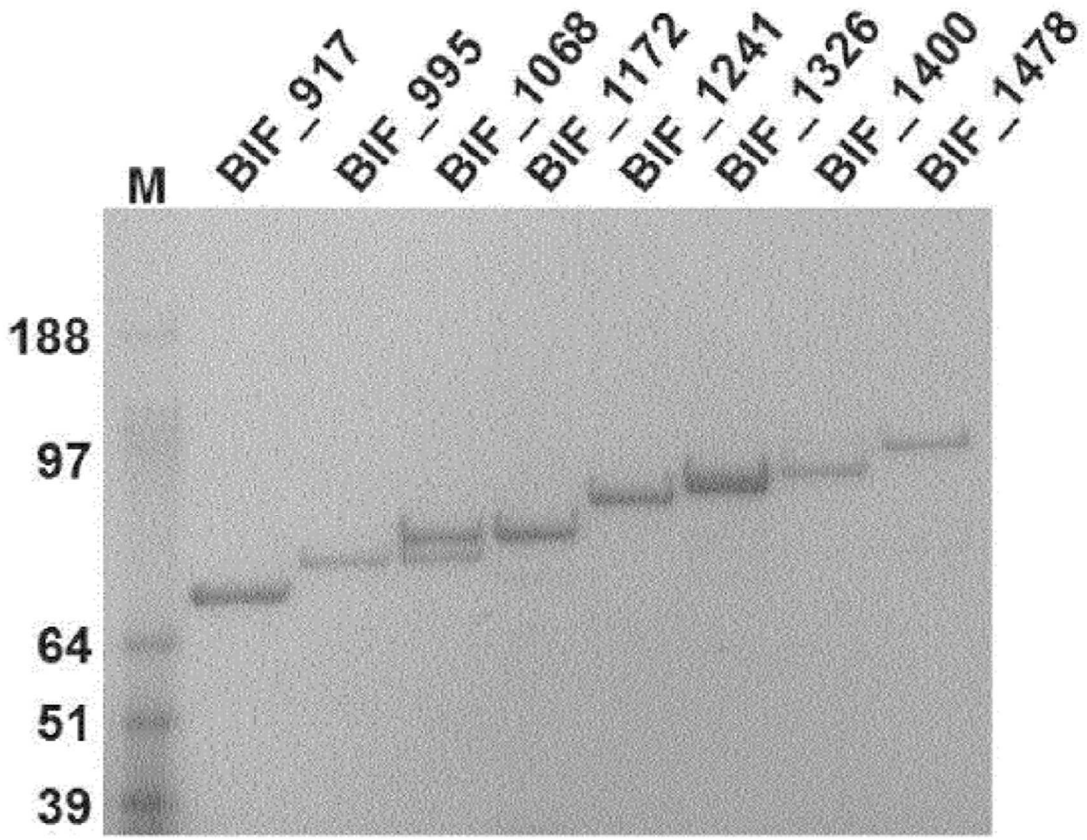

M
BIF_917
BIF_995
BIF_1068
BIF_1172
BIF_1241
BIF_1326
BIF_1400
BIF_1478
188
97
64
51
39

Figura 3

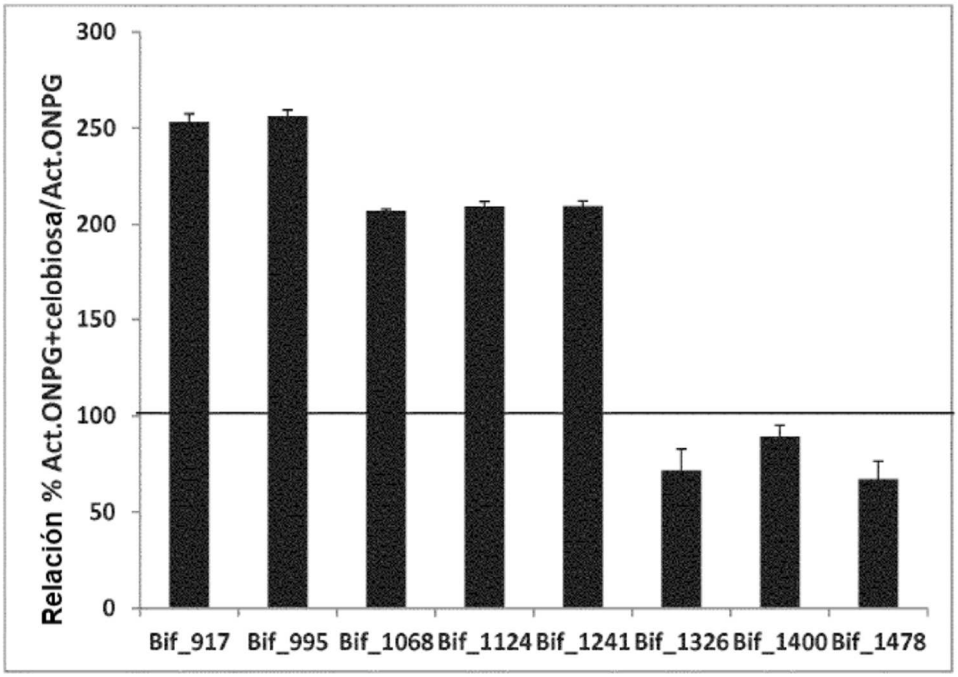

Relación % Act.ONPG+celobiosa/Act.ONPG
300
250
200
150
100
50
0
Bif_917
Bif_995
Bif_1068
Bif_1124
Bif_1241
Bif_1326
Bif_1400
Bif_1478

Figura 4

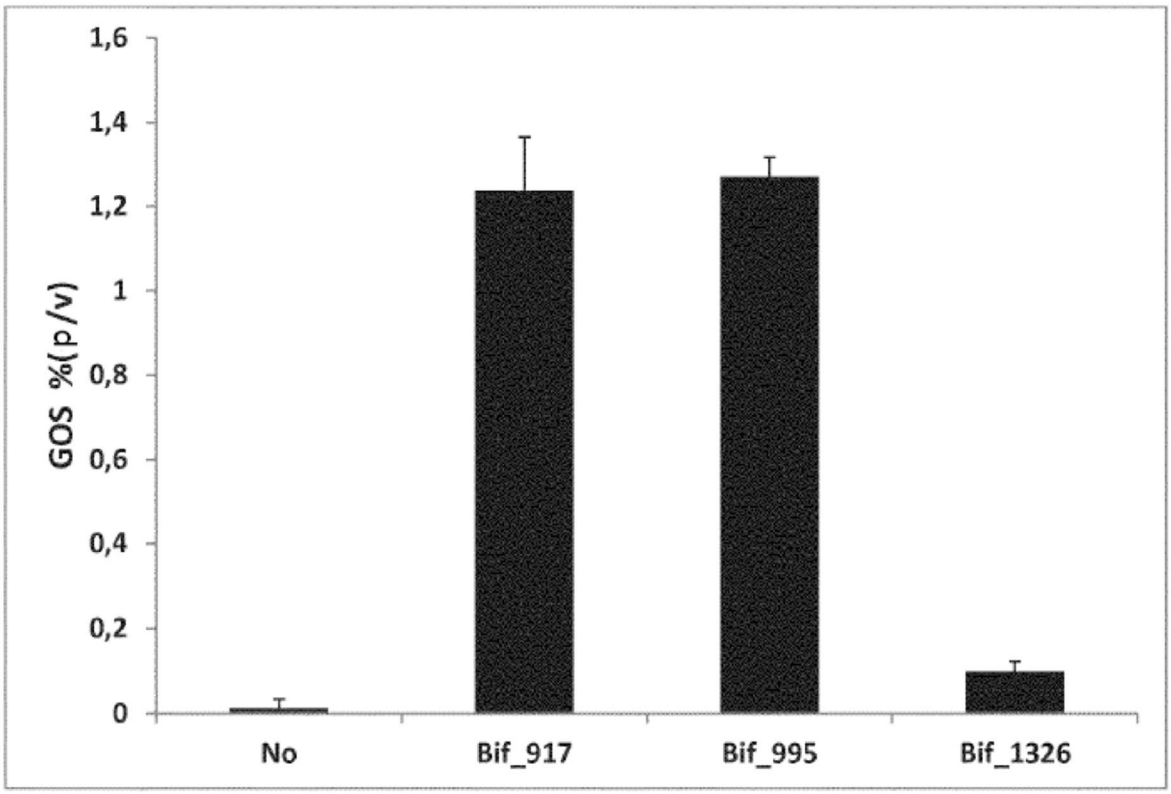
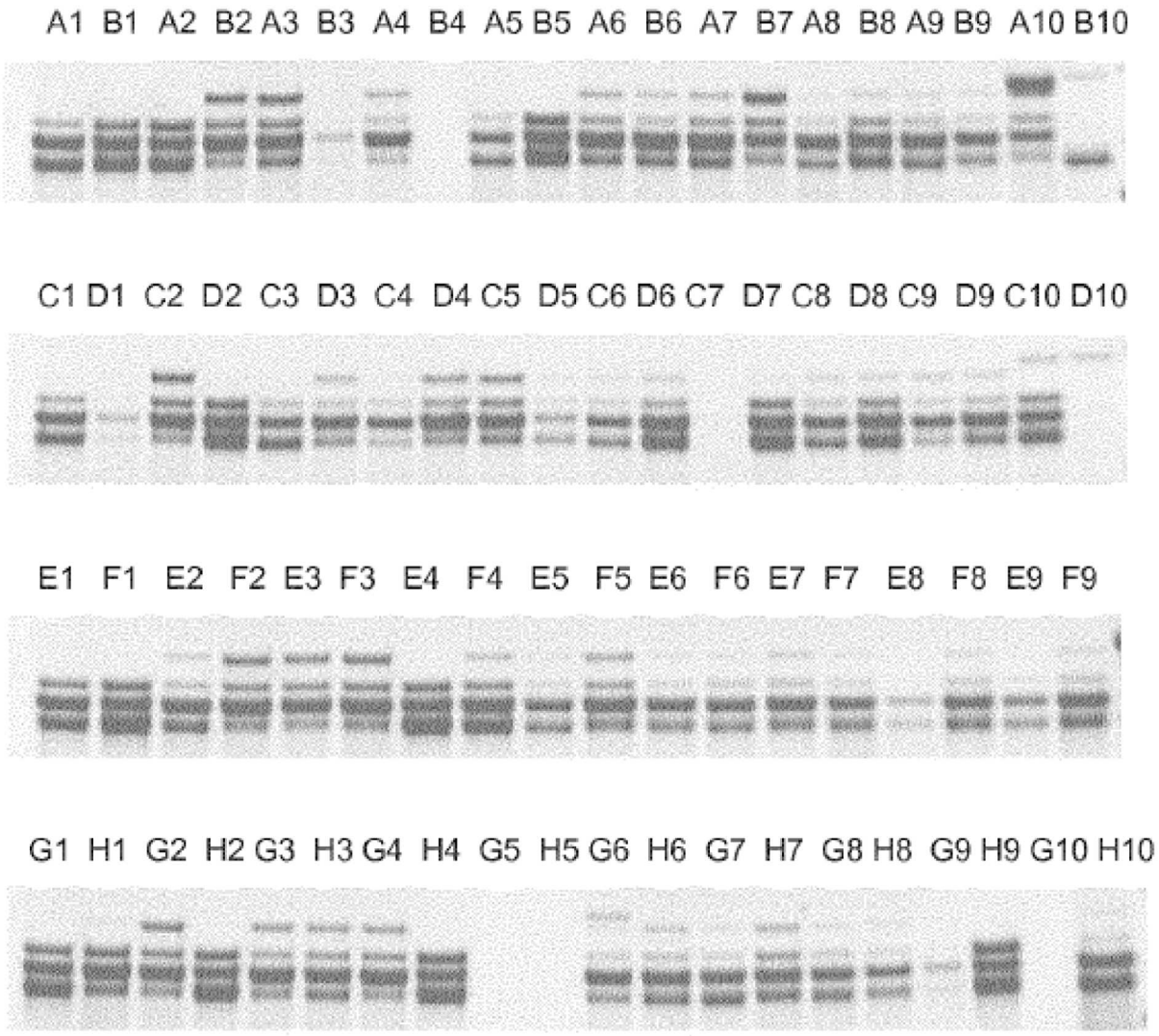


Figura 5


A1 B1 A2 B2 A3 B3 A4 B4 A5 B5 A6 B6 A7 B7 A8 B8 A9 B9 A10 B10
C1 D1 C2 D2 C3 D3 C4 D4 C5 D5 C6 D6 C7 D7 C8 D8 C9 D9 C10 D10
E1 F1 E2 F2 E3 F3 E4 F4 E5 F5 E6 F6 E7 F7 E8 F8 E9 F9
G1 H1 G2 H2 G3 H3 G4 H4 G5 H5 G6 H6 G7 H7 G8 H8 G9 H9 G10 H10
BIF_1068
BIF_995
BIF_917