



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 234 067**

51 Int. Cl.:

**A21D 8/04** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **98202468 .9**

96 Fecha de presentación : **22.07.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0897667**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.1999**

54 Título: **Composición para mejorar el pan.**

30 Prioridad: **31.07.1997 EP 97202386**  
**31.07.1997 EP 97202387**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.06.2005**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.05.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.05.2009**

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:  
**Van Beckhoven, Rudolf Franciscus Wilhelmus**

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 234 067 T5

## DESCRIPCIÓN

Composición para mejorar el pan.

5 La presente invención se refiere a la utilización de una enzima en la fabricación de pan como actividad de mejora del pan.

10 Una actividad de mejora del pan es aquella que mejora cualquier propiedad del producto horneado (particularmente el volumen del pan y/o la estructura de la miga de pan), y/o mejora cualquier propiedad de la masa. A lo largo de esta especificación el término “volumen de pan” debe interpretarse como volumen del producto horneado cuando corresponda.

15 Además de los ingredientes básicos, generalmente harina, agua, levadura y sal, a la masa se añade una composición de mejora del pan.

20 Una de las características más importantes del pan es su volumen, en el que influyen las enzimas. Para obtener un gran volumen en el pan se pueden añadir composiciones que contengan hemicelulasa y/o enzimas amilolíticas. Las hemicelulasas se definen como aquellas enzimas capaces de hidrolizar los polisacáridos sin almidón en la harina. Las composiciones comercialmente disponibles proceden en su mayoría de hongos, tales como *Aspergillus* o *Trichoderma*. Estas composiciones son mezclas impuras de distintas actividades enzimáticas. Hasta ahora se han identificado endo-xilanasas y arabinofuranosidasas que contribuyen a la actividad de las composiciones de mejora del pan.

25 La utilización de las preparaciones de hemicelulasa en la fabricación del pan proporciona al producto horneado acabado un mayor crecimiento en el horno, mejoran el volumen del pan y proporcionan una mejor textura de grano. Sin embargo, cuando se utilizan preparaciones de hemicelulasa a concentraciones más altas, la masa puede volverse floja y pegajosa. Esto limita la utilización de las preparaciones de hemicelulasa. Aunque el problema pueda superarse mediante la adición de glucosaoxidasa, la necesidad de añadir una enzima adicional es un inconveniente. Mejor sería disponer de una enzima con actividad de mejora del pan que no tuviera ningún efecto secundario negativo sobre la masa. Esto plantea la posibilidad de que los emulsionantes puedan ser sustituidos completamente por enzimas. La resistencia de los consumidores a los aditivos químicos está creciendo y por ello existe la necesidad constante de reemplazar los emulsionantes por aditivos aceptados por los consumidores tales como las enzimas.

30 La presente invención, tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas, proporciona la utilización de una CelobioHidrolasa-I (CBH-I) con actividad de mejora del pan para su fabricación. Los efectos más importantes son un volumen mejorado del pan y una estructura mejorada de la miga que no vienen acompañados de incómodas propiedades referidas a la manipulación de la masa porque ésta se vuelva pegajosa. Preferentemente, la CBH-I es de origen microbiano, con más preferencia se utiliza CBH-I de hongos. Por ejemplo la CBH-I puede obtenerse a partir de *Trichoderma* o *Aspergillus*. La CBH-I puede obtenerse de *T. reesei*, *T. longibrachiatum* y *T. viride*. Las Celobiohidrolasas I procedentes de *Trichoderma reesei* han sido descritas en EP-B 0 137 280 y US 4.894.338, respectivamente. La CBH-I ha sido identificada también en *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma viride* y *Humicola grisea*. La presente invención también describe una composición con actividad de mejora del pan, que comprende CBH-I en una cantidad efectiva cuando se añade a otros ingredientes básicos de la masa. La composición puede comprender también cantidades efectivas de  $\alpha$ -amilasa y/o endo-xilanasas.

45 Por “cantidad efectiva” se entiende una cantidad de enzima que es suficiente para proporcionar un efecto mensurable sobre el efecto pretendido, en el caso de CBH-I se trataría de un efecto mensurable del volumen mejorado del pan o de la estructura mejorada de la miga.

50 El hecho de que la CBH-I tenga un efecto en la cocción es sorprendente porque la CBH-I actúa sobre la celulosa que constituye solamente el 0,3% de la harina de trigo. La CBH-I hidroliza los enlaces 1,4- $\beta$ -D-glicosídicos en la celulosa provocando la liberación de celobiosa. Una explicación posible sería que la CBH-I actúa sobre las interfaces celulosa-xilano en las paredes celulares del endosperma.

55 Como ya se ha mencionado anteriormente, la utilización de preparaciones comerciales de endo-xilanasas de *Trichoderma* y *Aspergillus* es conocida. Aunque se encuentren trazas de CBH-I en estas preparaciones, la cantidad de CBH-I es insuficiente para contribuir a la mejora de la masa o del pan. De acuerdo con la presente invención, la CBH-I puede utilizarse sola o en combinación con otras enzimas con actividad de mejora del pan, preferentemente endo-xilanasas. La endo-xilanasas puede obtenerse a partir de *Aspergillus* o *Trichoderma*. Generalmente, la utilización de la composición de la invención producirá una masa con buenas propiedades de manipulación, mientras que el producto horneado final tendrá un volumen y una estructura de miga mejorados.

60 Con la utilización de la CBH-I es posible una optimización controlada de los productos de mejora del pan, o de las composiciones de mejora del pan.

65 Se entenderá que una especialista es capaz de encontrar las cantidades óptimas que puedan añadirse a la masa de pan.

## ES 2 234 067 T5

Una composición de la invención puede utilizarse en combinación con los constituyentes normales de mejora del pan y enzimas, por ejemplo xilanasas,  $\alpha$ -amilasa, endo-xilanasas, arabinofuranosidasas,  $\beta$ -amilasa, glucosaoxidasas, proteasa o lipasa. La CBH-I por tanto puede incorporarse en una composición de mejora del pan. Por “composición de mejora del pan” se entiende una composición que comprende sustancias distintas de las que se utilizan convencionalmente en la cocción (es decir, harina, agua, levadura, opcionalmente sal), y que pueden emplearse para mejorar las propiedades de la masa y/o del producto horneado.

La CBH-I puede incorporarse igualmente en una premezcla. Por “premezcla” debe entenderse una mezcla de agentes de cocción, incluyendo generalmente harina, que se prepara para facilitar la manipulación en los procesos de preparación de la masa. Normalmente, una premezcla no contendrá el agua necesaria para preparar la masa.

La masa de pan de la invención contiene al menos 0,5 mg de CBH-I por kilogramo de harina, preferentemente 1 mg/kg de harina, con más preferencia más de 5 mg de CBH-I por kilogramo de harina, incluso con más preferencia más de 10 mg de CBH-I por kilogramo de harina. En general, la cantidad de CBH-I es inferior a 100 mg de CBH-I por kilogramo de harina, preferentemente es inferior a 50 mg de CBH-I por kilogramo de harina.

### Leyenda de las figuras

Figura 1: Sec. Id. N° 5

Figura 2: Sec. Id. N° 8

Figura 3: El volumen de pan en función de la cantidad de CBH-I.

### Ejemplo 1

Se obtuvo CBH-I a partir de una cepa *Trichoderma*. La cepa se cultivó en un medio que contenía celulosa para producir enzimas de degradación de celulosa. Después de la fermentación se filtró el caldo, se filtró en estéril, se sometió a ultrafiltración y se secó por aspersión. 0,5 kg del producto de este proceso se suspendieron en 2 l de NaAc 50 mM a pH 5 y se centrifugó la mezcla durante 15 minutos a 4.000 rpm. El sobrenadante claro se ultrafiltró hasta llegar a una conductividad inferior a 2 mS.

Se cargaron aproximadamente 3 gramos de proteína en una columna A DEAE (Biogel A) equilibrada en NaAc 50 mM pH 5. Las fracciones enriquecidas de CBH-I se eluyeron según un gradiente lineal del 0% al 100% de B en A, en el cual A es un tampón que contiene NaAc 50 mM pH 5 y B es NaCl 1 M en el Tampón A, el pH se ajusta a 5.

Las fracciones enriquecidas de CBH-I se ultrafiltraron hasta que la conductividad fuese inferior a la conductividad de NaAc 10 mM pH 3,6. La muestra de CBH-I se cargó entonces en una columna Mono S que estaba equilibrada en NaAc 10 mM pH 3,6. La CBH-I se eluyó según un gradiente lineal del 0% al 100% de B en A, seguido por un gradiente del 10% al 100% de B en A, donde A es NaAc 10 mM pH 3,6 y B es NaCl 1 M en A. La concentración de proteína en cada fracción eluída se determinó mediante la utilización de un análisis cuantitativo de aminoácidos. El producto purificado contenía 7 mg de proteína/ml y era puro según se estimó por electroforesis en gel SDS.

### Ejemplo 2

Se ensayó la CBH-I (ver el Ejemplo 1) en un ensayo de cocción a gran escala utilizando la receta siguiente:

- \* 2.000 g de harina Kolibri - (Meneba) y 500 g de Ibis (Meneba);
- \* 1.305 g de agua;
- \* 50 g de levadura en bloque, Konings gist®;
- \* 50 g de sal;
- \* 12,5 g de azúcar;
- \* 25 ppm de ácido ascórbico;
- \* 20 ppm de Fermizime® - (TM) P200 ( $\alpha$ -amilasa de hongo, disponible de Gist-Brocades);
- \* opcionalmente Fermizyme® HS 2000 y/o CBH-I (*Trichoderma*), ver Tabla 1.

Se mezclaron conjuntamente los ingredientes y se utilizaron para formar tres masas de 900 gramos. Se fermentaron estas masas. La primera fermentación durante 30 minutos y la segunda durante 40 minutos a 30°C. Después de darle forma a la masa, se realizó una fermentación final durante 70 minutos a 35°C. Se horneó entonces el pan durante 30

## ES 2 234 067 T5

minutos a 250°C. Posteriormente se dejaron enfriar las barras de pan y se determinó el volumen del pan mediante el método de desplazamiento de semillas de colza. Se determinaron también otras propiedades.

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 1.

Cada ensayo de cocción se realizó por triplicado. Estas pruebas triplicadas se llevaron a cabo en paralelo. La evaluación de las barras de pan se da en valor promedio de los resultados obtenidos de 3 barras. Las características de la masa y de la estructura de la miga fueron estimadas por panaderos cualificados.

TABLA 1

Adición	Cantidad en mg/kg harina	Manipulación de la masa	Volumen	Aumento de volumen (%)	Estructura de la miga
Ninguna		0	3.831	0	--
Fermizyme HS2000	60	0	4.099	7	+
Fermizyme HS2000	120	--	4.291	12	-
CBH-I	3,5	+	4.090	7	+
CBH-I	7	+++	4.215	10	++
Fermizyme HS2000 y CBH-I-I	60	+++	4.294	12	++
	3,5				
Fermizyme HS2000 y CBH-I	60	+++	4.401	15	+++
	7				

-- = muy pobre

- = pobre

0 = neutro

+ = bueno

++ = muy bueno

+++ = excelente

## ES 2 234 067 T5

Fermizyme® HS2000 es una preparación de endo-xilanasas de *A. niger* de la firma Gist-Brocades. Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 1, la CBH-I mejora las propiedades de manipulación de la masa así como la estructura de la miga de pan, tanto cuando se utiliza sola como en combinación con Fermizyme® HS2000.

### 5 Ejemplo 3

Se clonó un gen que codificaba una CBH procedente de *A. niger* y se preparó una muestra de CBH mediante la expresión de la enzima clonada tal como se describe en el Ejemplo 5.

10 Se realizó un ensayo de cocción utilizando el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 2. Se añadieron 2,5 mg de la CBH de *A. niger* expresada por kilogramo de harina. Esto resultó en un incremento de volumen de la barra de pan del 10%, en unas propiedades mejoradas de manipulación de la masa y en una estructura mejorada de la miga en comparación con la referencia donde no se añadía CBH.

### 15 Ejemplo 4

Se realizó un ensayo de cocción tal como se describe en el Ejemplo 2, excepto que la harina empleada era harina Kluut (Meneba) y que se utilizó un mezclador de distinto tipo. Se añadió CBH-I (ver Ejemplo 1) procedente de *Trichoderma* además de una preparación de *Trichoderma* (hemicelulasa) comercial. La preparación de hemicelulasa se ensayó a 15 ppm (la cantidad recomendada era de 3 a 20 ppm). Tal como se muestra en la Figura 3, puede obtenerse un incremento significativo en volumen además del ocasionado por la preparación de hemicelulasa. El volumen de la referencia, donde no se añadía ni hemicelulasa ni CBH-I, era de 2.554 ml.

### Ejemplo 5

25

Cepas:

*E. coli* LE 392 (Murray, 1977):

30

e14<sup>-</sup> (*mcrA*) *hsdR514*, *supE44*, *supF58*, *lacY1*, ó  $\Delta$ (*lac1ZY*)6, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*

### Ejemplo 5.1

#### Identificación de una celobiohidrolasa de *A. niger*

35

Se cultivó *A. niger* N402 en un medio mínimo (MM) de *Aspergillus* (contiene por litro: 6,0 g de NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de KCl, pH 6,0 y 1 ml de una solución Vishniac (Vishniac and Santer, 1957, contiene por litro: 10 g de EDTA, 4,4 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,0 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,32 g de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,32 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,22 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,47 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,0 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 4,0) y se completó con un 1,5% de arabinoxilano de trigo. Este medio se inoculó con 1x10<sup>6</sup> esporas por ml y se cultivó el micelio durante 96 horas a 30°C y 250 rpm en un batidor orbital New Brunswick. Se recogió el filtrado del cultivo después de filtrar el micelio en un Myracloth (gasa de nylon) utilizando un embudo Büchner y aspiración suave. Se ajustó el pH del filtrado del cultivo a pH 6,0 con NaOH 0,1M, después de lo cual el filtrado del cultivo se diluyó mediante adición de 2 volúmenes de agua Millipore.

45

DEAE-Sephadex A-50 fue equilibrado en un tampón de acetato sódico 50 mM a pH 5,0 y se añadió al filtrado del cultivo. A los 30-60 minutos de agitación a 4°C, se pasaron el DEAE-Sephadex junto con el filtrado del cultivo por un embudo con un soporte de filtro de vidrio y se transfirió el DEAE-Sephadex A-50 a una columna. Esta columna primero se eluyó con un tampón de acetato sódico 50 mM a pH 5,0, luego con un tampón de acetato sódico 50 mM a pH 5,0 + NaCl 0,5 M. Las fracciones que contenían la actividad  $\alpha$ -arabinofuranosidasa, detectada utilizando el sustrato cromogénico 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido (detecta las  $\alpha$ -arabinofuranosidasas) (Sigma M-9519), se juntaron y desalaron mediante diálisis contra agua Millipore y posteriormente se dializaron contra un tampón piperazina-HCl 20 mM a pH 5,0. Después de la diálisis, la muestra se cargó en una columna de Flujo Rápido DEAE-Sefarosa, esta columna primero se eluyó con 3 volúmenes de un tampón de piperazina-HCl 20 mM a pH 5,0 y luego con un gradiente lineal de NaCl 0,5 M en tampón piperazina-HCl 20 mM a pH 5,0. La detección de la proteína eluída se realizó por medición continua de la absorción UV a 280 nm. Se recogieron las fracciones de 10 ml sobre *para*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido (PNP-A) (Sigma N-3641), que fueron analizadas en cuanto a su actividad  $\alpha$ -arabinofuranosidasa. Se encontró actividad  $\alpha$ -arabinofuranosidasa en las fracciones 11-27, 41-47 y 52-61. Se juntaron las fracciones 41-47 y posteriormente se dializaron contra un tampón de piperazina-HCl 100 mM a pH 5,0 y se cargó la muestra completa (200 ml) en una columna DEAE Sefarosa FF (Pharmacia) para concentrar la proteína a un único valor máximo mediante un gradiente NaCl 1 M en tampón piperazina-HCl 200 mM a pH 5,0. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron (20 ml) y primero se dializaron contra agua Millipore, después contra piperazina-HCl 20 mM a pH 5,0 y finalmente se concentraron en un concentrador Speed Vac a 6 ml. Esta preparación se cargó en una columna Sephacryl S-300, la cual se eluyó con piperazina-HCl 20 mM a pH 5,0, NaCl 0,1 M. Las fracciones que tenían actividad sobre PNP-A se juntaron, se dializaron contra piperazina-HCl 10 mM a pH 5,0 y se concentraron en un concentrador Speed Vac a 2 ml. Esta muestra se cargó entonces en una columna (columna Hiload 16/60) Superdex 75 (Pharmacia) que se equilibró y eluyó con piperazina-HCl 20 mM a pH 5,0, NaCl 0,1M. Las fracciones que tenían actividad de  $\alpha$ -arabinofuranosidasa se dializaron contra un tampón de acetato sódico 10 mM a pH 3,5. La purificación final se realizó en una

65

## ES 2 234 067 T5

columna de intercambio catiónico Mono S (HR 5/5, Pharmacia). La columna se equilibró con un tampón de acetato sódico 10 mM a pH 3,5 en la cual se cargó la muestra. La proteína se eluyó utilizando 27 ml de un gradiente lineal de NaCl 1 M en tampón acetato sódico 10 mM a pH 3,5. La enzima se eluyó en aproximadamente 100 mM de NaCl.

5 La enzima purificada se envió a EUROSEQUENCE (Groningen, Holanda). Allí se aplicó a un gel de SDS-PAGE y se realizó esencialmente un análisis de secuencia interna de la proteína tal como el descrito en Rosenfeld y col. (Rosenfeld, J., Cadevielle, J., Guillemot, J., Ferrara, P. (1992) Anal. Biochem. 203: 173-179).

10 Se estudiaron las secuencias de aminoácidos utilizando un secuenciador automatizado (Modelo 477A, Applied Biosystems) acoplado a HPLC (Modelo 120A ABI) para el análisis de los aminoácidos feniltiodantoina (PTH). Se determinaron las secuencias internas siguientes:

Leu-Tyr-Leu-Met-Ser-Asp-Asp-Ser-Asn-Tyr-Glu-Leu-Phe-Lys

15 (SEC. ID. NO. 1)

Leu-Gly-Asn-Thr-Asp-Phe-Tyr-Gly-Pro-Gly-Leu-Thr-Val-Asp-Thr-Asn- Ser-Pro-Phe-Thr-Val-Val-Thr-Gln

20 (SEC. ID. NO. 2)

De forma sorprendente, la secuencia parcial de aminoácidos del fragmento interno de la enzima aislada (SEC. ID. NO. 1) mostró una alta identidad con el CBH-I de *Agaricus bisporus*, es decir que 11 de 13 residuos eran idénticos. Esto fue la primera indicación de celobiohidrolasas en *Aspergillus*.

25

### Ejemplo 5.2

*Aislamiento de la codificación de los clones de ADNc para la celobiohidrolasa de A. niger*

30

#### Ejemplo 5.2.1

*Generación de una sonda*

35 La enzima CBH-I de *A. bisporus* es codificada por el gen *cel2* (EMBL Acc. No. Z50094). Los dos oligonucleótidos siguientes fueron destinados al PCR, región de codificación del *cel2*:

5'-GTC GGT ACC AAC ATG GCC G-3' (19-mer) (SEC. ID. NO. 3)

40

5'-ACT CAG AAA CAT TGG CTA TAG-3' (21-mer) (SEC. ID. NO. 4)

Estos oligonucleótidos, tal como están descritos en las SEC. ID. NOs. 3 y 4, fueron utilizados en PCR (Saiki y col., 1988) utilizando ADN de plásmido que contenía secuencias *cel2* de *Agaricus bisporus* como molde.

45

Para un PCR se combinaron 2 ng de plásmido de ADN con 5  $\mu$ l 10 x tampón reactivo (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl); 3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 4,0  $\mu$ l 1,25 mM de cada uno de los cuatro trifosfatos desoxinucleótidos y 50 pmol de oligonucleótidos en un volumen final de 50  $\mu$ l. Se mezcló la mezcla de reacción y se añadieron 0,5  $\mu$ l de TAQ-polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (Life Technologies). El ADN fue desnaturalizado térmicamente mediante incubación durante 5 minutos a 95°C seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C y 1 minuto a 72°C. Después de estos 25 ciclos la mezcla fue incubada durante 5 minutos a 72°C. El análisis de los productos de reacción reveló un producto discreto de 1,5 kb, que era el tamaño esperado.

50

#### Ejemplo 5.2.2

55

*<sup>32</sup>P-marcado del fragmento PCR de 1,5 kb*

El fragmento de 1,5 kb obtenido por PCR se aisló y marcó tal como se describe en EP-A-0 463 706, Ejemplos 2.2 y 7.1.

60

#### Ejemplo 5.2.3

*Cribado de la biblioteca de ADNc N400 de A. niger para obtener clones de ADNc de celobiohidrolasa*

65 La construcción de la biblioteca de ADNc de *A. niger* viene descrita en WO 96/06935 (Ejemplo 3).

Para cribar la biblioteca de ADNc N400 de *A. niger* con el fin de obtener los clones de ADNc *CBH*, 5x10<sup>3</sup> pfu por placa fueron colocados en placas topagarosa NZYCM, que contenían un 0,7% de agarosa en placas NZYCM

## ES 2 234 067 T5

(1,5% agar) de 85 mm de diámetro como las descritas en Maniatis y col., 1982, pp. 64, utilizando *E. coli* LE392 como bacteria de placa.

Después de incubar las placas durante toda la noche a 37°C se realizaron dos réplicas de cada una en filtros HybondN (Amersham) tal como se describe en Maniatis y col. (1982, pp. 320-321).

Los filtros se prehibridaron a 65°C durante dos horas en un tampón de hibridación que contenía 6 x SSC, 0,5% SDS, 5 x solución Denhardt, 0,01 M EDTA y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado térmicamente (Boehringer Mannheim). Después de dos horas de prehibridación, el tampón de prehibridación fue sustituido por un tampón de hibridación que era idéntico al de prehibridación, pero que contenía el fragmento marcado <sup>32</sup>P PCR de 1,5 kb con las secuencias *cel2* de *Agaricus bisporus* y se preparó tal como se describe en el Ejemplo 5.2.2. Los filtros fueron hibridados durante 18 horas a una temperatura de 60°C.

Después de la hibridación, los filtros se lavaron primero a 60°C durante 30 minutos en 4 x SSC/0,5% SDS, seguido por dos etapas de lavado a 60°C durante 30 minutos en 2 x SSC/0,5% SDS. Los filtros secados al aire se extrajeron en una hoja de papel Whatman 3 MM, se marcaron con tinta radioactiva y se cubrieron el papel Whatman y los filtros con Saran Wrap. Las placas de hibridación se identificaron por exposición a película de rayos-X Kodak XAR durante 72 horas a -70°C utilizando una pantalla de intensificación.

Se encontraron aproximadamente cincuenta pocillos de hibridación positiva por cada placa, que aparecieron en duplicado. Se seleccionaron doce pocillos positivos de la placa con una pipeta Pasteur y se eluyeron los fagos del obturador de agar en 1 ml de tampón SM que contenía 20 µl de cloroformo, tal como se describe en Maniatis y col. (1982, p. 64). Los fagos obtenidos fueron purificados por repetición del procedimiento descrito anteriormente mediante la utilización de réplicas filtradas procedentes de las placas que contenían 50-100 pocillos de fagos aislados.

Después de la purificación los fagos se colocaron en placas de 5x10<sup>3</sup> fagos en un medio NZYCM. Después de incubación durante toda la noche a 37°C se obtuvieron unas placas confluyentes, a partir de las cuales se eluyeron los fagos mediante la adición de 5 ml de tampón SM y se almacenaron las placas durante 2 horas a 4°C con agitación intermitente. Después de recoger el sobrenadante con una pipeta, se eliminaron las bacterias de la solución mediante centrifugación a 4.000g durante 10 minutos a 4°C. Se añadió al sobrenadante cloroformo al 0,3% y se determinó el número de pfu. Estos almacenamientos de fagos contienen aproximadamente 10<sup>7</sup> pfu/ml.

### Ejemplo 5.2.4

#### 35 *Análisis de restricción de los clones CBH-I de ADNc*

Clones recombinantes Uni-ZAP XR que contenían *CBH-I ADNc* se convirtieron en fagómidos Bluescript por superinfección con el fago filamentoso auxiliar ExAssist<sup>TM</sup>, que está incluido en el kit de síntesis ZAP<sup>TM</sup>-ADNc de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 El ADN del fagómido fue posteriormente aislado tal como se describe en Sambrook y col. (1989, pp. 1.25-1.28).

Se sometió a análisis de restricción el ADN aislado de ocho clones de *CBH ADNc* utilizando las enzimas de restricción siguientes: *EcoRI* y *XhoI*. El ADN fue digerido durante 2 horas a 37°C en una mezcla de reacción compuesta por las soluciones siguientes: 2 µl (»1 µg) de solución de ADN; 2 µl del tampón adecuado 10xReact (Life Technologies); 10 U de cada enzima de restricción (Life Technologies) y agua destilada estéril hasta conseguir un volumen final de 20 µl. Después de la adición de 4 µl de un tampón de carga de ADN, se cargaron las muestras en un 0,7% de gel TAE-agarosa. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis a 80 V durante 1,5 horas. El análisis de restricción de los clones de ADNc aislados revelaron dos tipos de plásmido; uno que contenía injertos de 1,2 kb, los demás injertos de 1,8 kb.

### Ejemplo 5.2.5

#### 55 *Análisis de la secuencia del clon CBH-I ADNc de A. niger, CBHA-C9*

La secuencia de los clones *CBH ADNc* de *A. niger* se determinó mediante subclonación de los fragmentos procedentes de uno de los clones positivos del Ejemplo 5.2.4 con un injerto de 1,8 kb, llamado CBHA-C9, en pBluescript SK (SEC. ID. N.º. 5). Las reacciones de secuenciación se realizaron por medio del kit secuenciador de marcado fluorescente de ciclo principal ThermoSequenase (Amersham) con cebadores universales de secuenciación. Las reacciones de secuenciación se analizaron en un secuenciador ALFexpress (Pharmacia). El análisis de la secuencia se realizó mediante el programa Winstar (LaserGene) y produjo la secuencia tal como se muestra en la Figura 1/SEC. ID. NO. 5. La secuencia de aminoácidos de la región codificante, correspondiente a los nucleótidos 49 a 1404, se muestra en la Figura 2/SEC. ID. NO. 8. La región codificante que codifica la enzima nativa (aminoácido 18 a 452) más su presencia (aminoácido 1 a 17). La proteína no contiene ningún péptido enlazante, ni tampoco ningún campo ligante de celulosa.

## ES 2 234 067 T5

### Ejemplo 5.2.6

#### *Cribado de la biblioteca genómica de A. niger para el gen CBHA*

5 Para cribar la biblioteca genómica de *A. niger* construida tal como se describe en Harmsen y col. (1990), para obtener el gen *CBHA*, se colocaron  $3 \times 10^3$  pfu por placa en placas en top-agarosa NZYCM que contenía un 0,7% de agarosa sobre cinco placas de NZYCM (1,5% agar) de 85 mm de diámetro tal como se describe en Maniatis y col., 1982, pp. 64, utilizando *E. coli* LE392 como bacteria de placa.

10 Después de incubar durante toda la noche las placas a 37°C se realizaron dos réplicas de cada una en filtros HybondN (Amersham) tal como viene descrito en Maniatis y col. (1982, pp. 320-321).

15 Los filtros fueron prehibridizados a 68°C durante dos horas en un tampón de prehibridación que contenía: 6xSSC, 0,5% de SDS, una solución 5xDenhardt, EDTA 0,01 M y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado térmicamente (Boehringer Mannheim). Después de dos horas de prehibridación, el tampón de prehibridación fue sustituido por un tampón de hibridación que era idéntico al tampón de prehibridación, pero que contenía el injerto marcado con <sup>32</sup>P de 1,8 kb procedente del clon CBH-IA-C9 de ADNc y se preparó tal como se describe en el Ejemplo 5.2.2. Los filtros fueron hibridizados durante 18 horas a una temperatura de 68°C.

20 Después de la hibridación, los filtros se lavaron primero a 68°C durante 30 minutos en 4xSSC/0,1% de SDS, seguido por un segundo lavado a 68°C durante 30 minutos en 2xSSC/0,1% de SDS. Los filtros se lavaron entonces dos veces a 68°C durante 30 minutos con 0,1xSSC/0,1% de SDS. Los filtros secados al aire se extrajeron en un papel Whatman 3 MM, se hicieron marcas de manipulación con tinta radioactiva y se cubrieron el papel Whatman y los filtros con Saran Wrap. Las placas de hibridación se identificaron mediante exposición a película de rayos-X Kodak XAR durante 72 horas a -70°C utilizando una pantalla de intensificación.

25 Se encontraron de dos a tres pocillos de hibridación positiva por cada placa, que aparecieron en duplicado. Cinco de ellos fueron recogidos de la placa utilizando una pipeta Pasteur y se eluyeron los fagos del obturador de agar en 1 ml de tampón SM que contenía 20 µl de cloroformo, tal como se describe en Maniatis y col. (1982, pp. 64). Los fagos obtenidos fueron purificados por repetición del procedimiento descrito anteriormente utilizando réplicas de filtro procedentes de las placas que contenían 50-100 pocillos de los fagos aislados.

### Ejemplo 5.3

35 *Expresión del ADNc de CBH-IA en A. niger*

#### Ejemplo 5.3.1

#### *Construcción de un cassette de expresión de CBH-IA*

40 El clon CBHA-C9 de ADNc del Ejemplo 5.2.5 se utilizó para construir un plásmido de expresión. Todas las digestiones se realizaron mediante 1-3 µg de ADN, 2 µl del tampón adecuado 10xReact (Life Technologies), 10 U de enzima Restriction (Life Technologies) y agua destilada estéril hasta obtener un volumen final de 20 µl. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 1-2 horas. Las muestras digeridas se cargaron en un gel de agarosa al 0,7% en un tampón TAE y los fragmentos de ADN fueron separados posteriormente mediante electroforesis a 80 V. Después de la electroforesis se cortó la banda correspondiente y el fragmento de ADN se aisló utilizando el kit GeneClean™ (Bioel 101 Inc.) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Las ligaciones se realizaron en un tampón 10xligante (Promega), 50-100 ng del vector de ADN, un exceso molar del triple de ADN de injerto, 1 U de T4-Ligasa que resultaron en un volumen final de 10 µl. Después de incubación durante toda la noche a 15°C, 4 µl de la mezcla se utilizaron para transformar las células competentes DH5α de *E. coli* preparadas como sigue: 200 µl de un cultivo precultivado durante toda una noche de DH5α de *E. coli* en un medio LB (medio LB por cada 1.000 ml: 10 g de peptona triptíca (Life Technologies), 5 g de extracto de levadura (Life Technologies), 10 g de NaCl, 0,5 mM Tris-HCl a pH 7,5. Este cultivo se incubó en un agitador orbital a 37°C hasta que su densidad correspondiera a un O.D. 600 de 0,15-0,2. Se recogieron entonces las bacterias mediante centrifugación a 3.000 rpm a 4°C. Después de desechar el sobrenadante, las células se mantuvieron constantemente en hielo. El aglomerado bacteriano se lavó en 40 ml de tampón de transferencia K-MES (por cada 100 ml: 6 ml de CaCl<sub>2</sub> 1M, 0,5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M, 4 ml de K-MES 0,5M a pH 6,0, 0,5 ml de MnCl<sub>2</sub> 1M) mediante resuspensión de estas células seguida por centrifugación tal como se ha descrito anteriormente. Finalmente, las células fueron sometidas a resuspensión en 10 ml de K-MES/glicerol (= tampón de transferencia K-MES + 15% de glicerol). Partes alícuotas (50 µl) se utilizaron bien sea en el momento para la transformación o bien se congelaron a -70°C.

65 Las células competentes DH5α de *E. coli* se utilizaron en los experimentos de transformación por combinación de 50 µl de la suspensión de células con 4,5 µl de la mezcla de ligación. Después de un período de incubación de 30 minutos en hielo, se incubaron las células durante 2 minutos a 42°C. Luego se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron las células a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se recogieron las bacterias por centrifugación a 14.000 g durante 20 segundos, después de desechar el sobrenadante las células se resuspendieron en 100 µl de medio LB. La suspensión bacteriana resultante se colocó en placas en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de X-gal y 60 µg/ml de IPTG en el caso de cribado azul/blanco.

## ES 2 234 067 T5

Una selección de 2-12 de las colonias resultantes se cultivó durante una noche en un medio LB que contenía 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina. De los cultivos se aisló el ADN de plásmido mediante el método de lisis alcalina descrito en Maniatis y col. (1982, pp. 368-369), que se utilizó en el análisis de restricción tal como se describe en el Ejemplo 5.2.4 para seleccionar un clon con el plásmido deseado.

5 Los métodos anteriormente descritos se utilizaron para construir el plásmido de expresión *CBHA* designado por pIM3006. El plásmido promH, que contenía el promotor *pkiA* de *A. niger*, fue digerido con *SstI* y *NsiI* y se ligó dentro del pCBHA-C9 digerido por *SstI-NsiI*. Después de linealización del plásmido resultante, que contenía la fusión de *pkiA-CBHA*, utilizando *SstI*, este constructo fue parcialmente digerido utilizando *BglIII*. El fragmento *SstI-BglIII* de 10 2,4 kb se ligó dentro de un plásmido digerido por *BamHI-SstI* que llevaba un fragmento *BamHI-HindIII* y que contenía el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*. El lugar de restricción de *BglIII* caía aproximadamente a 150 pb “aguas abajo” del codón de parada putativo. El constructo resultante se designó como pIM3006.

Se aisló el ADN de plásmido a gran escala a partir de los cultivos de 100 ml de DH5 $\alpha$  de *E. coli* que contenían el 15 plásmido de expresión final pIM3006 cultivado en un medio LB con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina utilizando el kit PC-100 Nucleobond (Nagel) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### Ejemplo 5.3.2

20 *Introducción del constructo de expresión CBH-IA en 752.1 de A. niger mediante cotransformación y cribado de los transformantes para la expresión del gen CBHA de A. niger*

El plásmido pIM3006, obtenido en el Ejemplo 3.1, fue introducido en *A. niger* por cotransformación del 752.1 de *A. niger* utilizando *pyrA* de *A. niger* como marcador selectivo sobre el plásmido pGW635 (Goosen y col., 1989) y el 25 plásmido pIM3006 como plásmido cotransformante.

Se prepararon protoplastos a partir de micelio mediante cultivo de 752.1 de *A. niger* sobre un medio mínimo completado por un 0,5% de extracto de levadura, un 0,2% de casaminoácidos, glucosa 50 mM, leucina 1,5 mM y uridina 10 mM durante 18 horas a 30°C. La preparación de protoplastos de 752.1 de *A. niger* y el procedimiento de 30 transformación se realizaron tal como se describe en Goosen y col., 1987. Los transformantes  $\text{PYR}^+$  resultantes se analizaron en cuanto a la expresión del gen *CBHA* de *A. niger* mediante SDS-PAGE.

Se analizaron los transformantes en cuanto a la formación del producto genético *CBHA* de *A. niger*, la proteína 35 *CBH-IA*. Se utilizaron doce de estos transformantes en un experimento de cultivo para analizar la expresión de *CBHA*. Los transformantes se cultivaron en 50 ml de medio mínimo (medio por litro: 15 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de KCl, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 6 g de  $\text{NaNO}_3$ , 1 ml de solución Vishniac (Vishniac and Santer, 1957), a pH 6,0) que contenía un 4% de D-fructosa, un 0,1% de extracto de levadura y leucina 1,5 mM durante 30 horas a 30°C. Después del cultivo, se eliminó el micelio por filtración y se analizó el filtrado del cultivo por medio de SDS-PAGE. El transformante 40 752.1::pIM3006-55 fue el mejor productor de *CBH-IA* (aprox. 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

### Ejemplo 5.3.3

#### *Purificación de la enzima de CBH-IA*

45 Un matraz Erlenmeyer de 1 litro que contenía 300 ml de medio (medio por litro: 4 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de KCl, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml de una solución de sal Vishniac (contiene por litro 10 g de EDTA, 4,4 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,32 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,32 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,22 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,47 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH de 4,0 (Vishniac and Santer, 1957), de pH 5,0 completado con un 0,2% de extracto ultrafiltrado de levadura (Life Technologies), un 0,5% de casaminoácidos (Life Technologies), leucina 10 50 mM y un 5% de sacarosa como fuente-C) fue inoculado con  $2 \times 10^9$  esporas de la cepa 752.1::pIM3006-55 y se cultivó durante 6 horas a 30°C. La totalidad de este cultivo se añadió entonces a 1,7 litro de medio en un fermentador Applikon de 3 litros (BTS06) que estaba controlado por una unidad Bioprocesadora ADI 1020 (Applikon). La temperatura de fermentación estaba controlada a 30°C y se dejó caer el pH hasta un pH de 3,0 al cual se mantuvo mediante adición de NaOH 5N. Se drenó desde el fermentador 1,9 litros de caldo de cultivo 30 horas después de la inoculación. Los 55 micelios se separaron del caldo de cultivo por filtración. Se volvió a llenar el fermentador con 2 litros de medio de cultivo fresco y se cultivó durante otras 30 horas tal como se describe más arriba. Después de esta segunda operación, los micelios se separaron del caldo de cultivo por filtración. Los filtrados de cultivo procedentes de ambas operaciones se combinaron y se añadió piperazina a una concentración final de 10 mM. El pH se ajustó a un pH de 5,5 con NaOH 10N. Se colocó entonces el filtrado de cultivo en una columna de intercambio aniónica Streamline<sup>TM</sup> (Farmacia). 60 Después de cargarla, la columna se lavó con piperazina-HCl (pip-HCl) 10 mM a pH 5,5. La enzima fue eluída de la columna aplicando un pulso salino utilizando pip-HCl 10 mM a pH 5,5/NaCl 1 M. Se recogieron fracciones de 15 ml y se detectó la actividad CBH mediante un sustrato cromogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-celobiosido (detecta las celobiohidrolasas) (Sigma M-6018). La mayoría de la actividad de CBH estaba presente en las fracciones 2, 3 y 4. Se juntaron estas fracciones y se dializaron contra pip-HCl 10 mM a pH 5,5.

65

## ES 2 234 067 T5

### Referencias

**Goosen, T., Engelenburg, F. van, Debets, F., Swart, K., Bos, K., Briek, H. van den, (1989)** *Mol. Gen. Genet.* 219: 282-288.

5

**Harmsen, J.A.M. y col., (1990).** *Curr. Genet.* 18: 161-166.

**Maniatis T., E. F. Fritsch, J. Sambrook (1982):** Molecular cloning, a laboratory manual; *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.

10

**Murray, N. (1977)** *Mol. Gen. Genet.* 150: 53-58.

**Saiki R.K. y col., (1988)** *Science*, 239, 487-491.

15

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, NY.

**Visniac, W. and Santer, M. (1957),** *Bact. Rev.* 21: 195-213.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización de celobiohidrolasa-I (CBH-I) en una cantidad efectiva para mejorar:

5

(i) las propiedades de manipulación de una masa;

(ii) el volumen del pan; y/o

10

(iii) la estructura de la miga de pan.

2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la CBH-I está incluida en una composición que comprende además otras enzimas con actividad de mejora del pan.

15

3. Utilización según la reivindicación 2, **caracterizada** porque la composición comprende además los constituyentes usuales de mejora del pan.

4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la CBH-I se encuentra en una forma sustancialmente exenta de otro material fúngico.

20

5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la CBH-I se expresa a partir de un gen clonado.

6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la CBH-I es una CBH-I de *Aspergillus* o *Trichoderma*.

25

7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizada** porque la composición que comprende la CBH-I comprende además una  $\alpha$ -amilasa y/o endo-xilanasas en una cantidad efectiva.

30

8. Masa que comprende al menos 0,5 mg de CBH-I por kg de harina.

9. Proceso para producir una masa según la reivindicación 8, que comprende la mezcla de (i) harina, (ii) agua, (iii) levadura y (iv) CBH-I en una cantidad efectiva para formar una masa, o que complete una masa con CBH-I.

35

10. Proceso según la reivindicación 9 que comprende además la adición de endo-xilanasas y/o  $\alpha$ -amilasas.

40

45

50

55

60

65

CGAAATCACT AAAAGGAGAC GACTAGAGTC TTATACAATC TCATTACAAT<sup>50</sup>  
 GCATCAACGT GCCCTTCTCT TCTCAGCCCT GCTGACGGCT GTTCGCGCCC<sup>100</sup>  
 AGCAAGCCGG AACGCTCACG GAGGAAGTCC ATCCTTCCTT GACCTGGCAG<sup>150</sup>  
 AAATGCACTT CTGAAGGCAG CTGCACTGAA CAGAGTGGCT CAGTTGTCAT<sup>200</sup>  
 TGAICTCGAAC TGGCGCTGGA CCCATTCCGT CAATGACAGC ACCAATTGCT<sup>250</sup>  
 ACACTGGCAA CACCTGGGAT GCAACTCTCT GCCCTGATGA TGAGACCTGT<sup>300</sup>  
 GCGGCCAACT GCGCCCTGGA CGGAGCAGAC TACGAGTCCA CCTACGGTGT<sup>350</sup>  
 CACCACTGAC GGTGATTCAT TGACACTGAA ATTCGTCACT GGCTCCAATG<sup>400</sup>  
 TTGGCTCGCG GTTGTATCTA ATGGACACGA GCGACGAGGG ATACCAGACG<sup>450</sup>  
 TTCAACTTGC TTGACGCAGA GTTCACITTC GACGTTGATG TGTCTAACCT<sup>500</sup>  
 CCCATGTGGG CTAACCGCG CGTTGTACTT CACTGCAATG GACGCCGATG<sup>550</sup>  
 GTGGAGTCTC AAAATACCCT GCCAATAAGG CTGGAGCCAA GTACCGGAACA<sup>600</sup>  
 GGATACTGTG ACTCCCAATG CCCCCGGGAC CTGAAATTCA TCGACGGACA<sup>650</sup>  
 AGCCAACGTC GATGGCTGGG AACCTTCTAG CAACAATGAC AACACAGGTA<sup>700</sup>  
 TCGGCAATCA CGGTTCTTGC TGCCCTGAAA TGGATATCTG GGAGGCAAAC<sup>750</sup>  
 AAGATCTCGA CCGCATTGAC ACCCCATCCT TGTGACAGCA GCGAACAGAC<sup>800</sup>  
 CATGTGTGAG GGTAACTGACT GCGGTGGAAC CTAICTGGAT GATCGCTACG<sup>850</sup>  
 GAGGAACCTG CGACCCTGAC GGCTGCGACT TCAACCCTTA TCGCATGGGC<sup>900</sup>  
 AACGACTCTT TCTACGGTCC TGGCAAGACC ATCGACACCG GATCCAAGAT<sup>950</sup>  
 GACGGTTGTG ACCCAGTTC AACTGATGG CTCTGGCTCC CTCAGCGAGA<sup>1000</sup>  
 TCAAGCGTTA CTACGTGCAG AACGGAAATG TTATAGCGAA CGCTGATTC<sup>1050</sup>  
 AACATCTCTG GAGTGACTGG AACTCGATC ACAACGGACT TCTGCACTGC<sup>1100</sup>  
 GCAGAAGAAG GCCTTTGGCG ACGAGGATAT ATTCGCTGAG CACAATGGAC<sup>1150</sup>  
 TTGCTGGAAT CAGTGATGCC ATGTCTTCCA TGGTTCTCAT CTTGAGCTTG<sup>1200</sup>  
 TGGGATGATT ACTATGCCAG CATGGAGTGG CTCGACAGCG ACTATCCCGA<sup>1250</sup>  
 GAACGCTACC GCTACCGACC CAGGTGTTGC ACGCGGAACA TGGACTCGG<sup>1300</sup>  
 AATCAGGCGT CCCTGCGACA GTCGAGGGGG CGCATCCCGA TTCTTCGGTG<sup>1350</sup>  
 ACCTTCTCAA ACATCAAGTT CGGTCCCATC AACTCGACCT TCAGCGCTTC<sup>1400</sup>  
 CGCATAAGGG GAAGTGCAGG GTTCAGAGCC TCAATTACAT CCCACAAGCC<sup>1450</sup>  
 GAACACAACA GGACAGGTTC CTGGAACGGA ATATGGGAGA GTTGCGGGCT<sup>1500</sup>  
 TGTAATAGT CCGAAAAGTG GTCACTGCTT TTGTGTATCG GGCTGTCTTC<sup>1550</sup>  
 CCATTTTATT TTCATTCACT CCAGATTGAT TGATGCAGAT CTTGTTTGT<sup>1600</sup>  
 GATTCTTCA CTTCGTGCTG TGACTTTTG TACCTAACTT CACATTCGTT<sup>1650</sup>  
 TCTTTTCTGT TTTTGAGTCC ACTCAATCCA AGAGACAGTT GTTCCTTTGC<sup>1700</sup>

T

FIGURA 1

ES 2 234 067 T5

MHQRALLFSA LLTAVRAQQA GTLTBEVHPS LTWQKCTSEG SCTEQSGSVV<sup>50</sup>  
IDSNWRWTHS VNDSTNCYTG NTWDATLCPD DETCAANCAL DGADYESTYG<sup>100</sup>  
VTTDGDLSLTL KFVTGSNVGS RLYLMDTSDE GYQTFNLLDA EFTFDVDVSN<sup>150</sup>  
LPCGLNGALY FTAMDADGGV SKYPANKAGA KYGTGYCDSQ CPRDLKFIDG<sup>200</sup>  
QANVDGWEPS SNNDNTGIGN HGSCCPMDI WEANKI STAL TPHPADSSEQ<sup>250</sup>  
TMCEGNDCGG TYSDDRYGGT CDPDGCDFNP YRMGNDSFYG PGKTIDTGSK<sup>300</sup>  
MTVVTQFITD GSGSLSEIKR YYVQNGNVIÀ NADSNISGVT GNSITTFDCT<sup>350</sup>  
AQKKAFGDED IFAEHNGLAG ISDAMSSMVL ILSLWDDYYA SMEWLSDYP<sup>400</sup>  
ENATATDPGV ARGTCDESEG VPATVEGAHP DSSVTFSNIK FGPINSTFSA<sup>450</sup>  
SA

FIGURA 2

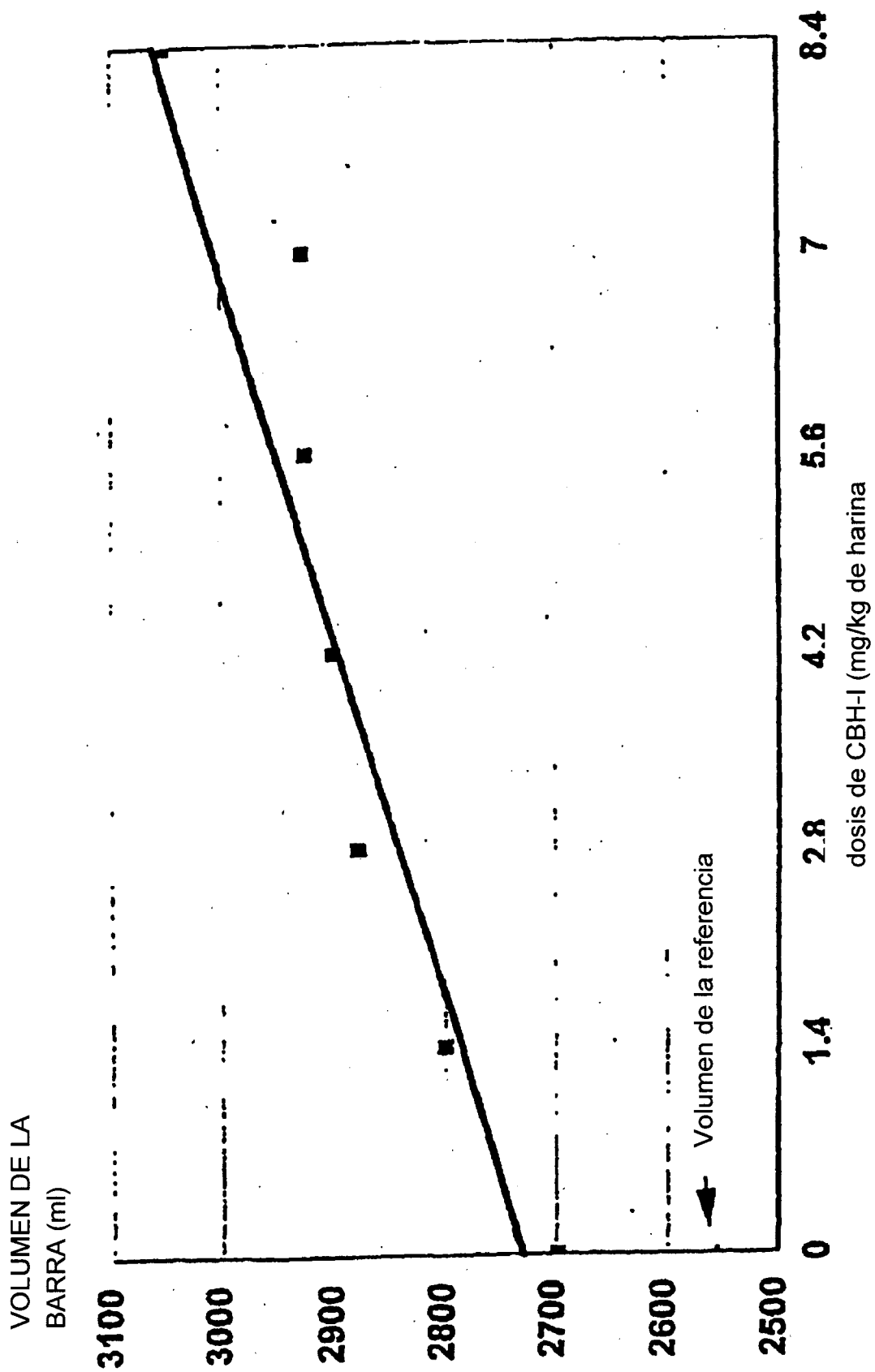


FIGURA 3