

**"CÉLULA HOSPEDADORA RECOMBINANTE QUE EXPRESA ACTIVIDAD DE
BETA-GALACTOSIDASA Y/O TRANSGALACTOSIDANTE DEFICIENTE EN
MANANASA, CELULASA Y PECTINASA"**

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una célula hospedadora en donde están inactivadas enzimas no deseadas y al uso de esta célula hospedadora en la preparación de una composición enzimática para su uso en la fabricación de un producto alimentario con propiedades no deseadas reducidas.

10 **Antecedentes de la invención**

 El uso de enzimas para mejorar la naturaleza química de productos alimentarios está ampliamente difundido. Asimismo, en el procesado de la leche de vaca y otros sustratos de origen animal, el uso de enzimas añade un
15 valor significativo al producto final.

 Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos que no son digeribles por los seres humanos y los animales y comprenden dos o más moléculas de galactosa, típicamente hasta nueve, unidas mediante enlaces glucosídicos. Los GOS
20 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 mediante la estimulación selectiva de la proliferación de microorganismos colónicos beneficiosos, tales como bacterias, para proporcionar
25 beneficios fisiológicos al consumidor. Los efectos para la salud establecidos han dado como resultado un interés creciente en los GOS como ingredientes alimentarios para diversos tipos de alimentos.

 La enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) hidroliza
30 normalmente a la lactosa en los monosacáridos D-glucosa y D-galactosa. En la reacción enzimática normal de las β -

galactosidasas, la enzima hidroliza la lactosa y se une transitoriamente al monosacárido de galactosa en un complejo de galactosa-enzima que transfiere la galactosa al grupo hidroxilo del agua, dando como resultado la liberación de D-galactosa y D-glucosa. Sin embargo, a concentraciones elevadas 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. Asimismo, a concentraciones elevadas de lactosa, algunas β -galactosidasas son capaces de transferir galactosa a los grupos hidroxilo de la lactosa o de oligosacáridos de un orden superior.

El género *Bifidobacterium* es uno de los tipos de cultivos bacterianos más comúnmente usados en la industria láctea para fermentar una diversidad de productos lácteos. La ingesta de productos que contienen bifidobacterias tiene además un efecto promotor de la salud. Este efecto se logra no solo mediante un pH reducido del contenido intestinal, sino también por la capacidad de las bifidobacterias de repoblar la flora intestinal en individuos que tienen su flora intestinal alterada debido a, por ejemplo, la toma de antibióticos. Además, las bifidobacterias tienen el potencial de desplazar a microorganismos intestinales potencialmente dañinos.

Se sabe que los galactooligosacáridos potencian el crecimiento de las bifidobacterias. Este efecto se logra probablemente mediante la capacidad única de las bifidobacterias para aprovechar los galactooligosacáridos como fuente de carbono. Además, se cree que la suplementación dietética con galactooligosacáridos tiene

una serie de efectos protectores frente a enfermedades a largo plazo. Por ejemplo, se ha demostrado que la ingesta de galactooligosacáridos es altamente protectora frente al desarrollo de cáncer colorrectal en ratas. Por lo tanto, existe un gran interés en desarrollar métodos baratos y eficaces para producir galactooligosacáridos para su uso en la industria para mejorar los suplementos dietéticos y los productos lácteos.

Se ha descrito una lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215 truncada con aproximadamente 580 aminoácidos (BIF3-d3) como una enzima transgalactosilante en una solución que contiene lactosa solubilizada en agua (Jørgensen et al. (2001), Appl. Microbiol. Biotechnol., 57: 647- 652). El documento WO 01/90317 describe también 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 un modo distinto en comparación con BIF3-d3 que da como resultado una hidrólisis eficaz y una baja producción de GOS cuando se prueba en leche.

El documento WO 2013/182686 describe un polipéptido que tiene una relación de actividad transgalactosilante a hidrólisis útil y que por lo tanto es un eficaz productor de GOS cuando se incuba con lactosa, incluso a niveles de lactosa muy reducidos, tales como en un producto a base de leche.

Sin embargo, sigue habiendo necesidad de proporcionar procesos mejorados para producir fibras dietéticas en forma

de GOS in situ a partir de lactosa en productos lácteos. La presente invención aborda esta necesidad.

Sumario de la invención

La actividad enzimática secundaria describe normalmente enzimas no deseadas cuya actividad afecta negativamente a un proceso o producto. Normalmente se encuentran en productos enzimáticos en forma de un subproducto de, por ejemplo, un hospedador productor y puede dificultar la aplicación comercial de dichas enzimas. Las aplicaciones lácteas son especialmente sensibles a pequeñas cantidades de las enzimas celulasa, pectinasa, amilasa y mananasa ya que muchos productos lácteos se formulan/estabilizan con hidrocoloides, por ejemplo, CMC, GUAR, almidón y pectina (véase la tabla 1).

Tabla 1

Enzima	Hidrocoloide/estabilizante degradable
Celulasa	CMC
Mananasa	GUAR, LBG
Pectinasa (pectato liasa)	Pectina
Aamilasa	Almidón

Los presentes inventores han sido capaces de desarrollar un producto que contiene actividad de β -galactosidasa, que tiene opcionalmente actividad transgalactosilante o GOS producido a partir del mismo en donde se reducen los niveles de celulasa, mananasa, pectinasa y amilasa. Como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes, los hidrocoloides producen una contribución importante para numerosos productos alimentarios y de bebida. La presente invención permite

proporcionar dichos productos alimentarios y de bebida en los que no solamente se retienen las propiedades deseadas del uso de hidrocoloides, sino que además los productos alimentarios y de bebida pueden retener las fibras dietéticas en forma de GOS.

Los hidrocoloides o las gomas son un grupo diverso de polímeros de cadena larga caracterizados por su propiedad de formar dispersiones y/o geles viscosos cuando se dispersan en agua. Estos materiales se hallaron en primer lugar en exudados de árboles o arbustos, en extractos de plantas o algas, en harinas de semillas o granos, en limos gomosos de procesos de fermentación y en muchos otros productos naturales. La aparición de un gran número de grupos hidroxilo aumenta notablemente su afinidad por la unión a moléculas de agua, convirtiéndolos en compuestos hidrófilos. Además, producen una dispersión, que es un intermedio entre una auténtica solución y una suspensión y muestra las propiedades de un coloide. Tomando en consideración estas dos propiedades, de manera adecuada se denominan "coloides hidrófilos" o "hidrocoloides".

Los hidrocoloides tienen una gran variedad de propiedades funcionales en los alimentos, incluyendo espesantes, gelificantes, emulsionantes, estabilizantes, de recubrimiento, etc. Los hidrocoloides tienen un profundo impacto en las propiedades alimentarias cuando se usan a niveles en el intervalo desde unas pocas partes por millón para el carragenano en productos lácteos tratados térmicamente hasta altos niveles de goma arábiga, almidón o gelatina en la confitería de gelatina. El principal motivo del amplio uso de hidrocoloides en alimentos es su capacidad para modificar la reología de los sistemas

alimentarios. Esto incluye dos propiedades básicas de los sistemas alimentarios, a saber, comportamiento de flujo (viscosidad) y propiedades mecánicas de sólido (textura). La modificación de la textura y/o viscosidad de los sistemas alimentarios ayuda a modificar sus propiedades sensoriales; por lo tanto, los hidrocoloides se usan como aditivos alimentarios importantes para lograr fines específicos. Es evidente que varios hidrocoloides pertenecen a la categoría de aditivos alimentarios permitidos en muchos países de todo el mundo. Muchas formulaciones alimentarias, tales como sopas, jugos de carne, aderezos de ensaladas, salsas y condimentos usan hidrocoloides como aditivos para lograr la viscosidad y sensación en boca preferidas. También se usan en muchos productos alimentarios, tales como helados, jaleas, gelatinas, postres gelificados, tartas y dulces para crear la textura deseada.

Además de los atributos funcionales, su futura aceptación y posiblemente recomendación positiva puede derivarse del reconocimiento de que las fibras aportan muchos beneficios fisiológicos a la función natural y bienestar del organismo.

Debido a sus propiedades de unión al agua, los hidrocoloides tienen una influencia significativa en la textura y sensación en boca de los productos alimentarios, a menudo creando oportunidades para la innovación en texturas. Varios de los productos también interactúan con proteínas, una propiedad útil para la estabilización y protección de proteínas. La presente invención proporciona soluciones basadas en el uso de hidrocoloides en las que no solo se retienen las propiedades deseadas anteriormente

mencionadas de los hidrocoloides, sino que además, los productos alimentarios y de bebida pueden contener fibras dietéticas en forma de GOS.

En los productos cultivados, los hidrocoloides
5 proporcionan una textura suave y una apariencia brillante. Los hidrocoloides pueden optimizar los costes en las formulaciones sólidas de leche reducida así como mantener la textura durante toda su vida útil. Los hidrocoloides también mejoran el cuerpo, especialmente a una temperatura
10 de consumo más elevada para los productos cultivados. La presente invención proporciona soluciones basadas en el uso de hidrocoloides en las que no solo se retienen las propiedades deseadas anteriormente mencionadas de los hidrocoloides, sino que además, los productos alimentarios
15 y de bebida pueden contener fibras dietéticas en forma de GOS.

En los productos lácteos y en las bebidas de proteínas de pH bajo, los hidrocoloides pueden estabilizar las proteínas lácteas y de la soja, prevenir la sedimentación y
20 la separación del suero lácteo y posibilitar una gran variedad de texturas. Además, los hidrocoloides pueden reemplazar la textura en formulaciones con sólidos lácteos, azúcar y/o grasa reducidos y de este modo proporcionar la fabricación alimentaria de un mejor producto bajo en grasa.
25 La presente invención proporciona soluciones basadas en el uso de hidrocoloides en las que no solo se retienen las propiedades deseadas anteriormente mencionadas de los hidrocoloides, sino que además, los productos alimentarios y de bebida pueden contener fibras dietéticas en forma de
30 GOS.

La presente invención aborda estos problemas proporcionando una composición enzimática que comprende un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante pero dicha composición enzimática carece o carece
5 sustancialmente de actividad atribuible a las siguientes enzimas: celulasa, mananasa, pectinasa y opcionalmente amilasa.

De acuerdo con un 1^{er} aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora capaz de expresar un
10 polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa y dicha célula hospedadora está modificada para que sea deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa.

En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa tal como se usa en la
15 invención tiene actividad transgalactosilante.

De acuerdo con un 2^o aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante y dicha célula hospedadora está modificada para que sea deficiente
20 para celulasa, mananasa y pectinasa.

Preferentemente, la célula hospedadora se modifica para que también sea deficiente para amilasa.

En una realización, la célula hospedadora se modifica mediante técnicas de mutagénesis convencionales.

25 En otra realización, la célula hospedadora se modifica mediante técnicas de manipulación genética convencionales.

De acuerdo con un 3^{er} aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa y en
30 donde los polipéptidos que tienen actividad de celulasa, mananasa y pectinasa están esencialmente inactivos.

De acuerdo con un 4° aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante y en donde los polipéptidos que tienen actividad de celulasa, mananasa y pectinasa están esencialmente inactivos.

Preferentemente, en la célula hospedadora además está esencialmente inactivo un polipéptido que tiene actividad de amilasa.

En una realización, en los aspectos 3° y 4°, los polipéptidos de celulasa, mananasa y pectinasa esencialmente inactivos y opcionalmente el polipéptido de amilasa están funcionalmente inactivos respecto de su actividad enzimática.

En una realización, los polipéptidos que tienen actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente el polipéptido que tiene actividad de amilasa se hacen esencialmente inactivos mediante técnicas de mutagénesis convencionales.

En otra realización, los polipéptidos que tienen actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente el polipéptido que tiene actividad de amilasa se hacen esencialmente inactivos mediante técnicas de manipulación genética convencionales.

Las técnicas de mutagénesis convencionales que pueden emplearse son mutagénesis química o física.

Las técnicas de manipulación genética convencionales que pueden emplearse son interrupción de genes en un paso, inserción de marcador, mutagénesis de sitio dirigido, eliminación, interferencia de ARN o ARN antisentido.

Preferentemente, la célula hospedadora es una bacteria.

La célula hospedadora puede ser una bacteria del ácido láctico.

Preferentemente, la célula hospedadora es B. subtilis.

Preferentemente, el polipéptido que tiene actividad
5 transgalactosilante empleado en la invención se selecciona entre el grupo que consiste en:

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

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

15 c. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96.5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 1300 restos de aminoácido,

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

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

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

En una realización, la célula hospedadora comprende un
5 vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa.

En una realización, la célula hospedadora se
transforma con un ácido nucleico que codifica el
10 polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa.

En una realización, la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante.

15 En una realización, la célula hospedadora se transforma con un ácido nucleico que codifica el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante.

De acuerdo con un 5° aspecto de la invención, se proporciona un método para proporcionar una composición de
20 polipéptido que comprende un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa y que tiene un contenido reducido de actividades enzimáticas secundarias de celulasa, mananasa y pectinasa no deseadas, comprendiendo el método: proporcionar una célula hospedadora capaz de expresar el
25 polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa, un polipéptido que tiene actividad de celulasa, un polipéptido que tiene actividad de mananasa y un polipéptido que tiene actividad de pectinasa; e inactivar dicha actividad de celulasa, mananasa y pectinasa.

30 De acuerdo con un 6° aspecto de la invención, se proporciona un método para proporcionar una composición de

polipéptido que comprende un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante y que tiene un contenido reducido de actividades enzimáticas secundarias de celulasa, mananasa y pectinasa no deseadas, comprendiendo el método:
5 proporcionar una célula hospedadora capaz de expresar el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante, un polipéptido que tiene actividad de celulasa, un polipéptido que tiene actividad de mananasa y un polipéptido que tiene actividad de pectinasa; e inactivar dicha actividad de
10 celulasa, mananasa y pectinasa.

Preferentemente, el método comprende además inactivar un polipéptido que tiene actividad de amilasa.

En una realización del método, los polipéptidos que tienen actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y
15 opcionalmente el polipéptido que tiene actividad de amilasa se hacen esencialmente inactivos mediante técnicas de mutagénesis convencionales.

En otra realización del método, los polipéptidos que tienen actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y
20 opcionalmente el polipéptido que tiene actividad de amilasa se hacen esencialmente inactivos mediante manipulación genética.

Preferentemente en el método, la célula hospedadora es una bacteria.

25 En una realización del método, la célula hospedadora es una bacteria del ácido láctico.

Preferentemente en el método, la célula hospedadora es B. subtilis.

30 Preferentemente en el método, el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante se selecciona entre el grupo que consiste en:

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

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

10 c. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96.5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 1300 restos de aminoácido,

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

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

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

30 En una realización del método, la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un ácido

nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa.

En otra realización del método, la célula hospedadora se transforma con un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa.

En una realización del método, la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante.

En otra realización del método, la célula hospedadora se transforma con un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante.

De acuerdo con un 7° aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa que comprende cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa y opcionalmente recuperar el polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa del medio de cultivo o de la célula hospedadora.

De acuerdo con un 8° aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante que comprende cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante y opcionalmente recuperar el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante del medio de cultivo o de la célula hospedadora.

De acuerdo con un 9° aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa que se produce usando la célula hospedadora de la invención o el proceso de la invención.

5 El polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa de acuerdo con la invención está preferentemente libre o sustancialmente libre de actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de actividad de amilasa.

En una realización, el polipéptido que tiene actividad
10 de β -galactosidasa de acuerdo con la invención está libre o sustancialmente libre de actividad de celulasa, mananasa y pectinasa, de tal forma que la reducción en la viscosidad presentada como una reducción relativa en la viscosidad es de al menos 0.85 o de al menos 0.9 o menor calculada a
15 partir de la viscosidad de una solución que contiene hidrocoloide a la que se añade el polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa en comparación con una solución de hidrocoloide a la que no se añade enzima o agua.

De acuerdo con un 10° aspecto de la invención, se
20 proporciona una composición de polipéptido que comprende un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa producido usando la célula hospedadora de la invención o el proceso de la invención.

De acuerdo con un 11° aspecto de la invención, se
25 proporciona un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante que se produce usando la célula hospedadora de la invención o el proceso de la invención.

El polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de acuerdo con la invención está preferentemente libre o
30 sustancialmente libre de actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de actividad de amilasa.

En una realización, el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de acuerdo con la invención está libre o sustancialmente libre de actividad de celulasa, mananasa y pectinasa, de tal forma que la reducción en la viscosidad presentada como una reducción relativa en la viscosidad es de al menos 0.85 o de al menos 0.9 o menor calculada a partir de la viscosidad de una solución que contiene hidrocoloide a la que se añade el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante en comparación con una solución de hidrocoloide a la que no se añade enzima o agua.

De acuerdo con un 12° aspecto de la invención, se proporciona una composición de polipéptido que comprende un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante producido usando la célula hospedadora de la invención o el proceso de la invención.

Preferentemente, la composición de polipéptido de la invención está libre o sustancialmente libre de actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de actividad de amilasa.

En una realización, la composición de polipéptido está libre o sustancialmente libre de actividad de celulasa, mananasa y pectinasa, de tal forma que la reducción en la viscosidad presentada como una reducción relativa en la viscosidad es de al menos 0.85 o de al menos 0.9 o menor calculada a partir de la viscosidad de una solución que contiene hidrocoloide a la que se añade la composición de polipéptido de la invención en comparación con una solución de hidrocoloide a la que no se añade enzima o agua.

De acuerdo con un 13^{er} aspecto de la invención, se proporciona un producto lácteo que comprende el polipéptido

que tiene actividad de β -galactosidasa de la invención o la composición de polipéptido de la invención.

De acuerdo con un 14° aspecto de la invención, se proporciona un proceso para producir un producto lácteo que comprende añadir un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa de la invención o una composición de polipéptido de la invención a un producto lácteo que comprende lactosa.

De acuerdo con un 15° aspecto de la invención, se proporciona un proceso para producir un producto lácteo que comprende GOS, comprendiendo dicho proceso añadir un polipéptido que tiene actividad de β -galactosidasa de la invención o una composición de polipéptido de la invención a un producto lácteo que comprende lactosa.

De acuerdo con un 16° aspecto de la invención, se proporciona el uso del polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de acuerdo con la invención o de una composición de polipéptido de acuerdo con la invención para preparar un producto lácteo.

De acuerdo con un 17° aspecto de la invención, se proporciona el uso del polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de acuerdo con la invención o de una composición de polipéptido de acuerdo con la invención para preparar un producto lácteo que comprende GOS.

De acuerdo con un 18° aspecto de la invención, se proporciona un producto lácteo que comprende el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de la invención o la composición de polipéptido de la invención.

De acuerdo con un 19° aspecto de la invención, se proporciona un proceso para producir un producto lácteo que comprende añadir un polipéptido que tiene actividad

transgalactosilante de la invención o una composición de polipéptido de la invención a un producto lácteo que comprende lactosa.

De acuerdo con un 20° aspecto de la invención, se proporciona un proceso para producir un producto lácteo que comprende GOS, comprendiendo dicho proceso añadir un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de la invención o una composición de polipéptido de la invención a un producto lácteo que comprende lactosa.

De acuerdo con un 21^{er} aspecto de la invención, se proporciona el uso del polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de acuerdo con la invención o de una composición de polipéptido de acuerdo con la invención para preparar un producto lácteo.

De acuerdo con un 22° aspecto de la invención, se proporciona el uso del polipéptido que tiene actividad transgalactosilante de acuerdo con la invención o de una composición de polipéptido de acuerdo con la invención para preparar un producto lácteo que comprende GOS.

En una realización, el uso de la invención es para prevenir una reducción en la viscosidad y/o la textura del producto lácteo en comparación con el uso del polipéptido que tiene actividad transgalactosilante que se prepara a partir de una célula hospedadora que expresa celulasa, mananasa y pectinasa.

La invención es particularmente útil para la producción in situ de fibras dietéticas de GOS en una composición, tal como un producto lácteo, que comprende lactosa.

Listado de secuencias

La SEQ ID NO: 1 (también denominado (BIF_917) en el presente documento) es un fragmento truncado de 887 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

5 La SEQ ID NO: 2 (también denominado (BIF_995) en el presente documento) es un fragmento truncado de 965 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

La SEQ ID NO: 3 (también denominado (BIF_1068) en el presente documento) es un fragmento truncado de 1038 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

10 La SEQ ID NO: 4 (también denominado (BIF_1172) en el presente documento) es un fragmento truncado de 1142 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

La SEQ ID NO: 5 (también denominado (BIF_1241) en el presente documento) es un fragmento truncado de 1211 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

La SEQ ID NO: 6 (también denominado (BIF_1326) en el presente documento) es un fragmento truncado de 1296 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

20 La SEQ ID NO: 7 es el núcleo catalítico de la glucósido hidrolasa de *Bifidobacterium bifidum*.

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

25 La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_917

La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_995

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1068

30 La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos que codifica BIF_1172

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

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

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

La SEQ ID NO: 16 es el cebador inverso para BIF917

La SEQ ID NO: 17 es el cebador inverso para BIF995

La SEQ ID NO: 18 es el cebador inverso para BIF1068

10 La SEQ ID NO: 19 es el cebador inverso para BIF1241

La SEQ ID NO: 20 es el cebador inverso para BIF1326

La SEQ ID NO: 21 es el cebador inverso para BIF1478

La SEQ ID NO: 22 es la lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215.

15 La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de señal de la lactasa extracelular de *Bifidobacterium bifidum* DSM20215.

Divulgación detallada de la invención

Definiciones

De acuerdo con la presente descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Debe entenderse que tal como se usan en el presente documento, las formas del singular "un", "uno", "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, 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 materia, y así sucesivamente.

30 A menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento

tienen el mismo significado que aquel entendido normalmente por un experto habitual en la materia. A continuación se proporcionan los siguientes términos.

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

En el presente contexto, la expresión "actividad transgalactosilante" significa la transferencia de un resto de galactosa a una molécula distinta de agua. La actividad
15 puede medirse como [glucosa] - [galactosa] generada en cualquier momento dado durante la reacción o mediante cuantificación directa del GOS generado en cualquier momento dado durante la reacción. Esta medición puede llevarse a cabo de diversos modos, tales como mediante un
20 método de HPLC tal como se muestra en los ejemplos. Cuando se comparan medidas de actividad transgalactosilante, estas se han efectuado a una concentración inicial de lactosa dada, tal como, por ejemplo, al 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% (p/p).

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

30 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 medición puede llevarse a cabo de diversos modos, tales como mediante un método de HPLC tal como se muestra en los ejemplos.

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

Relación de actividad transgalactosilante =
15 $(\text{Abs420}^{+\text{Celobiosa}} / \text{Abs420}^{-\text{Celobiosa}}) * 100\%$, donde $\text{Abs420}^{+\text{Celobiosa}}$ es la lectura de absorbancia a 420nm usando el método 3 descrito más adelante incluyendo celobiosa en la reacción y $\text{Abs420}^{-\text{Celobiosa}}$ es la lectura de absorbancia a 420nm usado el método 3 descrito más adelante pero sin celobiosa en la
20 reacción. La ecuación anterior es válida únicamente para diluciones donde la absorbancia es de entre 0.5 y 1.0.

En un aspecto, la actividad de cualquiera de las enzimas a las que se refiere la presente invención se mide después de 15 min. de reacción, 30 min. de reacción, 60 min.
25 de reacción, 90 min. de reacción, 120 min. de reacción o 180 min. de reacción. Por lo tanto, en un aspecto a modo de ejemplo, se mide la actividad relativa de transgalactosilación 15 minutos después de la adición de la enzima, tal como 30 minutos después de la adición de la
30 enzima, tal como 60 minutos después de la adición de la enzima, tal como 90 minutos después de la adición de la

enzima, tal como 120 minutos después de la adición de la enzima o tal como 180 minutos después de la adición de la 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 "se ha transgalactosilado la lactosa" significa que se ha unido covalentemente una molécula de galactosa a la molécula de lactosa tal como, por ejemplo unido covalentemente a uno cualquiera de los grupos hidroxilo libres en la molécula de lactosa o generada mediante transgalactosilación interna formando, por ejemplo, alolactosa.

En el presente contexto, se ensayó la evaluación de rendimiento de los polipéptidos divulgados en el presente documento en la producción de galactooligosacárido (GOS) en un "ensayo basado en leche" (imitación de aplicación de yogur). Se llevaron a cabo experimentos por lotes en un volumen de 100 μ l en placas MTP de 96 pocillos usando una mezcla de yogur que consistía en un 98.60%(p/v) de leche fresca pasteurizada baja en grasa (Arla Mini-mælk) y un 1.4% (p/v) de ingrediente de suero de leche Nutrilac YQ-5075 (Arla). Para hidratar completamente el Nutrilac YQ-5075, se dejó la mezcla en agitación durante 20 h y posteriormente se añadieron 20mM de fosfato de Na a pH 6.5 para asegurar

un pH de 6.5. Esta base de yogur se usó tal cual o con varios complementos, tales como lactosa, fucosa, maltosa, xilosa o sales adicionales. Se mezclaron 90 µl del yogur con 10 µl de enzima purificada o de fermento en bruto, se
5 selló con cinta y se incubó a 43°C durante 3 horas. La reacción se detuvo con 100 µl de Na₂CO₃ al 10%. Las muestras se almacenaron a -20°C. La cuantificación de los galactooligosacáridos (GOS), lactosa, glucosa y galactosa se llevó a cabo mediante HPLC. El análisis de las muestras
10 se llevó a cabo en un dispositivo Dionex ICS 3000. Los parámetros de LC fueron los siguientes: Fase móvil: NaOH 150 mM, Caudal: Isocrático, 0.25 ml/min, Columna: Carbowax PA1, Temperatura de la columna: TA, Volumen de inyección: 10 µl, Detector: PAD, Integración: Manual, Preparación de la muestra: dilución 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 máximas en porcentaje de área máxima del patrón. Se usó un jarabe de GOS (Vivanal GOS, Friesland Campina) como patrón para la
15 cuantificación de GOS.

La actividad transgalactosilante puede medirse mediante cuantificación HPLC o ensayos enzimáticos como se describe en el documento WO 2013/182686.

En el presente contexto, la expresión "secándose por pulverización dicho polipéptido" significa que el polipéptido se ha obtenido mediante secado por pulverización de un polipéptido que se encuentra en solución o suspensión a una temperatura adecuada y durante un periodo de tiempo adecuado para retirar el agua.
25

En el presente contexto, la expresión "encontrándose dicho polipéptido en solución" se refiere a un polipéptido
30

que es soluble en un disolvente sin precipitarse de la solución. Un disolvente para este fin incluye cualquier medio en el que puede producirse el polipéptido, tal como un tampón acuoso o una solución salina, un caldo de fermentación o el citoplasma de un hospedador 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 aromático de borato). En un aspecto, el estabilizante no es un poliol o el poliol está presente a un nivel del 0.1 % en peso o menos.

El término "aislado" significa que el polipéptido está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente distinto con el que normalmente se asocia la secuencia en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza y/o está sustancialmente libre de celulasa, mananasa, pectinasa o amilasa. En un aspecto, "polipéptido aislado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una pureza de al menos el 30%, una pureza de al menos el 40%, una pureza de al menos el 60%, una pureza de al menos el 80%, una pureza de al menos el 90% y una pureza de al menos el 95%, según se determina por SDS-PAGE.

Por lo tanto, la expresión "sustancialmente libre de celulasa" significa en el presente documento una preparación que contiene como máximo un 10%, preferentemente como máximo un 8%, más preferentemente como máximo un 6%, más preferentemente como máximo un 5%, más preferentemente como máximo un 4%, como máximo un 3%, aún más preferentemente como máximo un 2%, lo más

preferentemente como máximo un 1% e incluso más preferentemente como máximo un 0.5% en peso de celulasa. En el presente documento, la expresión "sustancialmente libre de" puede entenderse, por lo tanto, como sinónima de las expresiones "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

Por lo tanto, la expresión "sustancialmente libre de mananasa" significa en el presente documento una preparación que contiene como máximo un 10%, preferentemente como máximo un 8%, más preferentemente como máximo un 6%, más preferentemente como máximo un 5%, más preferentemente como máximo un 4%, como máximo un 3%, aún más preferentemente como máximo un 2%, lo más preferentemente como máximo un 1% e incluso más preferentemente como máximo un 0.5% en peso de mananasa. En el presente documento, la expresión "sustancialmente libre de" puede entenderse, por lo tanto, como sinónima de las expresiones "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

Por lo tanto, la expresión "sustancialmente libre de pectinasa" significa en el presente documento una preparación que contiene como máximo un 10%, preferentemente como máximo un 8%, más preferentemente como máximo un 6%, más preferentemente como máximo un 5%, más preferentemente como máximo un 4%, como máximo un 3%, aún más preferentemente como máximo un 2%, lo más preferentemente como máximo un 1% e incluso más preferentemente como máximo un 0.5% en peso de pectinasa. En el presente documento, la expresión "sustancialmente libre de" puede entenderse, por lo tanto, como sinónima de

las expresiones "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

Por lo tanto, la expresión "sustancialmente libre de amilasa" significa en el presente documento una preparación
5 que contiene como máximo un 10%, preferentemente como máximo un 8%, más preferentemente como máximo un 6%, más preferentemente como máximo un 5%, más preferentemente como máximo un 4%, como máximo un 3%, aún más preferentemente como máximo un 2%, lo más preferentemente como máximo un 1%
10 e incluso más preferentemente como máximo un 0.5% en peso de amilasa. En el presente documento, la expresión "sustancialmente libre de" puede entenderse, por lo tanto, como sinónima de las expresiones "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

15 La expresión "polipéptido sustancialmente puro" significa en el presente documento una preparación de polipéptido que contiene como máximo un 10%, preferentemente como máximo un 8%, más preferentemente como máximo un 6%, más preferentemente como máximo un 5%, más
20 preferentemente como máximo un 4%, como máximo un 3%, incluso más preferentemente como máximo un 2%, lo más preferentemente un 1% e incluso más preferentemente como máximo un 0.5% en peso de otro material polipeptídico con el que se asocia de manera natural. Por lo tanto, se
25 prefiere que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos un 92% puro, preferentemente al menos un 94% puro, más preferentemente al menos un 95% puro, más preferentemente al menos un 96% puro, más preferentemente al menos un 96% puro, más preferentemente al menos un 97%
30 puro, más preferentemente al menos un 98% puro, aún más preferentemente al menos un 99%, lo más preferentemente al

menos un 99.5% puro e incluso más preferentemente un 100% puro en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Los polipéptidos divulgados en el presente documento se encuentran preferentemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos se encuentren en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptido esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el que se asocie naturalmente. Esto puede lograrse, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes de sobra conocidos o mediante métodos de purificación clásicos. En el presente documento, la expresión "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

El término "purificado" o "puro" significa que un componente dado está presente a un estado de alto nivel, por ejemplo, al menos aproximadamente un 51% puro, tal como al menos un 51% puro o al menos aproximadamente un 75% puro, tal como al menos un 75% puro o al menos aproximadamente un 80% puro, tal como al menos un 80% puro o al menos aproximadamente un 90% puro, tal como al menos un 90% puro o al menos aproximadamente un 95% puro, tal como al menos un 95% puro o al menos aproximadamente un 98% puro, tal como al menos un 98% puro. De manera deseable, el componente es el componente activo predominante presente en una composición.

El término "microorganismo" en relación con la presente invención incluye cualquier "microorganismo" que pueda comprender una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención o una secuencia de nucleótidos

que codifica un polipéptido que tenga las propiedades específicas como se definen en el presente documento y/o productos obtenidos a partir de los mismos. En el presente contexto, "microorganismo" puede incluir cualquier bacteria
5 u hongo capaz de fermentar un sustrato lácteo.

La expresión "célula hospedadora", en relación con la presente invención, incluye cualquier célula que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se definen en el
10 presente documento o un vector de expresión como se describe anteriormente y que se usa en la producción de un polipéptido que tenga las propiedades específicas como se definen en el presente documento. En un aspecto, la producción es producción recombinante.

15 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 y camellos.

En el presente contexto, la expresión "sustrato a base
20 de leche" significa cualquier material lácteo crudo y/o procesado o un material procedente de los constituyentes de la leche. Los sustratos a base de leche útiles incluyen, pero sin limitación, soluciones/suspensiones de cualquier producto lácteo o similar a la leche que comprenden lactosa,
25 tal como leche entera o baja en grasa, leche desnatada, nata, leche en polvo reconstituida, leche condensada, soluciones de leche deshidratada, leche UHT, suero lácteo, permeato de suero lácteo, suero lácteo ácido o crema. Preferentemente, el sustrato a base de leche es leche o una
30 solución acuosa de polvo de leche desnatada. El sustrato a base de leche puede ser más concentrado que la leche cruda.

En una realización, el sustrato a base de leche tiene una relación de proteína a lactosa de al menos 0.2, preferentemente de al menos 0.3, al menos 0.4, al menos 0.5, al menos 0.6 o más preferentemente al menos 0.7. El
5 sustrato a base de leche puede homogeneizarse y/o pasteurizarse según métodos conocidos en la técnica.

La "homogeneización", tal como se usa en el presente documento, significa mezclado exhaustivo para obtener una suspensión o emulsión soluble. Puede llevarse a cabo para
10 separar la grasa de la leche en tamaños más pequeños de tal forma que no se separa de la leche. Esto puede lograrse forzando el paso de la leche a alta presión a través de pequeños orificios.

"Pasteurización", tal como se usa en el presente documento, significa reducir o eliminar la presencia de organismos vivos, tales como microorganismos, en el sustrato a base de leche. Preferentemente, la
15 pasteurización se logra manteniendo una temperatura específica durante un periodo de tiempo específico. La temperatura específica se logra normalmente por calentamiento. Pueden seleccionarse la temperatura y la duración para eliminar o inactivar determinadas bacterias, tales como bacterias dañinas y/o para inactivar enzimas en la leche. A continuación puede haber una etapa de
20 enfriamiento rápido. Un "producto alimentario" o una "composición alimentaria", en el contexto de la presente invención, puede ser cualquier alimento comestible o producto alimentario adecuado para su consumo por un animal o ser humano.

30 Un "producto lácteo" en el contexto de la presente invención puede ser cualquier producto lácteo en donde uno

de los componentes principales sea a base de leche. Preferentemente, el componente principal es a base de leche. Más preferentemente, el componente principal es un sustrato a base de leche que se ha tratado con una enzima que tiene
5 actividad transgalactosilante.

En el presente contexto, "uno de los componentes principales" significa un componente que tiene una materia seca que supone más de un 20%, preferentemente más de un 30% o más de un 40% de la materia seca total del producto
10 lácteo, mientras que "el componente principal" significa un componente que tiene una materia seca que supone más de un 50%, preferentemente más de un 60% o más de un 70% de la materia seca total del producto lácteo.

Un "producto lácteo fermentado" en el presente
15 contexto debe interpretarse como cualquier producto lácteo en donde forma parte del proceso de producción cualquier tipo de fermentación. Los ejemplos de productos lácteos fermentados son productos como el yogur, la nata, la crema fresca, el queso cuark y el queso fresco. Otro ejemplo de
20 un producto lácteo fermentado es el queso. Puede producirse un producto lácteo fermentado mediante cualquier método conocido en la técnica.

El término "fermentación" significa la conversión de carbohidratos en alcoholes o ácidos mediante la acción de
25 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 capaz de fermentar un
30 sustrato lácteo.

En el presente contexto, la expresión "dominios Pfam" significa regiones con una secuencia de proteína que se identifican como Pfam-A o Pfam-B basándose en múltiples alineamientos de secuencia y en 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. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman Nucleic Acids Research (2010) Edición de base de datos 38:D211-222.). Como ejemplos de dominios Pfam, pueden mencionarse Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532).

Tal como se usa en el presente documento, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácidos nucleicos de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

Tal como se usa en el presente documento, "célula transformada" incluye células, incluyendo tanto células bacterianas como fúngicas, que se han transformado mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. La transformación se produce normalmente mediante la inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula. La secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos 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 usa en el presente documento, "unido operablemente" significa que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de su

manera prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora
unida operablemente a una secuencia codificante está ligada
de tal forma que se logra la expresión de la secuencia
codificante en condiciones compatibles con las secuencias
5 de control.

Tal como se usa en el presente documento, un "vector"
se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para
introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos celulares.
Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de
10 expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de
fago, casetes y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término
"expresión" se refiere al proceso mediante el cual se
produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácidos
nucleicos de un gen. El proceso incluye tanto la
15 transcripción como la traducción. La expresión puede
implicar el uso de un organismo hospedador para producir el
polipéptido. Un organismo hospedador, también citado
simplemente como un hospedador, puede incluir procariotas y
eucariotas y puede, en algunas realizaciones, incluir
20 especies bacterianas y fúngicas.

Tal como se usa en el presente documento, "vector de
expresión" se refiere a una construcción de ADN que
contiene una secuencia codificante de ADN (por ejemplo,
25 secuencia génica) que está unida operablemente a una o más
secuencias de control adecuadas capaces de afectar la
expresión de la secuencia codificante en un hospedador.
Dichas secuencias de control incluyen un promotor para
efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional
30 para controlar dicha transcripción, una secuencia que
codifica sitios de unión a ribosomas en el ARNm adecuados y

secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar de manera independiente al genoma del hospedador o puede, en algunos casos, integrarse en el genoma en sí. El plásmido es la forma más comúnmente usada de vector de expresión. Sin embargo, la descripción pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que son o se han convertido en conocidas en la técnica.

Un "promotor" se refiere a una secuencia reguladora que está implicada en la unión a la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. El promotor puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivo. Un ejemplo no limitante de un promotor inducible que puede usarse es *cbh1* de *Trichoderma reesei*, que es un promotor inducible.

La expresión "unido operablemente" se refiere a la yuxtaposición en donde los elementos se encuentran en una disposición que les permite estar relacionados funcionalmente. Por ejemplo, un promotor está unido operablemente a una secuencia codificante en caso de que controle la transcripción de la secuencia codificante.

"Bajo control transcripcional" es una expresión bien entendida en la técnica que indica que la transcripción de una secuencia de polinucleótidos depende de que esté unida operablemente a un elemento que contribuye al inicio de o promueve la transcripción.

"Bajo el control traduccional" es una expresión bien entendida en la técnica que indica un proceso regulador que se produce después de que se haya formado el ARNm.

Un "gen" se refiere a un segmento de ADN que está
5 implicado en la producción de un polipéptido e incluye regiones que preceden y seguidas de las regiones codificantes, así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión
10 "célula hospedadora" se refiere a una célula o línea celular en la que puede transfectarse para la expresión de un polipéptido un vector de expresión recombinante para la producción del polipéptido. Las células hospedadoras incluyen la descendencia de una sola célula hospedadora y
15 la descendencia puede no ser completamente idéntica (en cuanto a su morfología o su complemento de ADN genómico total) a la célula parental original debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas. Una célula hospedadora incluye células transfectadas o transformadas
20 *in vivo* con un vector de expresión.

El término "recombinante, cuando se usa en referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o
25 proteína heteróloga o mediante la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa o que la célula procede de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la
30 célula o que expresa genes nativos que de otro modo se

expresan anormalmente, se expresan de menos o no se expresan en absoluto.

Una "secuencia de señal" (también denominada "presecuencia", "péptido de señal", "secuencia líder" o "péptido líder") se refiere a una secuencia de aminoácidos 5 unidos a la parte N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína a partir de la célula (por ejemplo, la SEQ ID NO: 5). La secuencia de señal dirige al polipéptido a la vía secretora y se escinde del polipéptido 10 naciente una vez que se trasloca en la membrana del retículo endoplasmático. La forma madura de la proteína extracelular (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1) carece de la secuencia de señal que se escinde durante el proceso de secreción.

La expresión "marcador selectivo" o "marcador de selección" se refiere a un gen capaz de expresarse en una 15 célula hospedadora que permite facilitar la selección de aquellos hospedadores que contienen un ácido nucleico o vector introducido. Los ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero sin limitación, sustancias antimicrobianas 20 (por ejemplo, higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional en la célula hospedadora.

El término "cultivar" se refiere a hacer crecer una 25 población de células microbianas en condiciones adecuadas para su crecimiento en un medio de cultivo líquido o sólido. La expresión "medio de cultivo" se refiere al medio usado en este proceso.

El término "introducido" en el contexto de la 30 inserción de una secuencia de ácidos nucleicos en una célula incluye "transfección", "transformación" o

"transducción" y se refiere a la incorporación de una secuencia de ácidos nucleicos en una célula eucariota o procariota, en donde la secuencia de ácidos nucleicos puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial),
5 convertirse en un replicón autónomo o expresarse de manera transitoria.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "transformado", "transformado de manera estable" y
10 "transgénico" se refieren a una célula que tiene una secuencia de ácidos nucleicos no natural (por ejemplo, heteróloga) integrada en su genoma o en forma de un plásmido episómico que se mantiene a lo largo de múltiples generaciones.

15 Tal como se usan en el presente documento, los términos "modificación" y "alteración" se usan de manera indistinta y significan cambiar o variar. En el contexto de la modificación o alteración de un polipéptido, estos términos pueden significar cambiar la secuencia de
20 aminoácidos, ya sea directamente o cambiando el ácido nucleico codificante o cambiar la estructura del polipéptido, tal como glucosilando la enzima.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de
25 biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular y bioquímica, que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda
30 edición (Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait,

ed., 1984; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1994); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); y Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (Kriegler, 1990).

5 A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que aquel entendido normalmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

10 Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, segunda ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Markham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos

15 usados en la presente invención. Pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención.

A menos que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi, respectivamente.

20

Los intervalos numéricos proporcionados en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo.

25

En los productos enzimáticos, las cantidades pequeñas de actividad enzimática no deseada se originan principalmente por el hospedador de producción y se citan como actividad enzimática secundaria. La presente invención se refiere a la reducción de la actividad enzimática

30

secundaria no deseada. La actividad enzimática en las

aplicaciones lácteas debería medirse preferentemente al pH y temperatura adecuados para la aplicación. En la leche, el pH varía de 6.4 a 6.8, en el yogur: pH ~4, en fórmulas infantiles, pH 5.9 -7.3, en mozzarella, pH 5.2-5.5 y en
5 mayonesa, pH 4. De manera óptima, el nivel de actividad no deseada puede determinarse mediante pruebas de aplicación en cada aplicación prevista.

Celulasa

En un aspecto, la presente invención se refiere a
10 composiciones que están libres o sustancialmente libres de actividad de celulasa. En otro aspecto, la presente invención proporciona una nueva bacteria en la que el gen que codifica la celulasa está inactivado. Dichas composiciones comprenden un polipéptido que tiene actividad
15 transgalactosilante. Las células hospedadoras de acuerdo con la presente invención son capaces de expresar el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante. Dicha actividad transgalactosilante debe estar presente a un nivel tal que puede producirse el GOS a partir de la
20 lactosa en un producto, es decir, preferentemente, el polipéptido está presente en la composición o la célula hospedadora es capaz de expresarlo a un nivel tal que pueden producirse fibras dietéticas en forma de GOS a partir de la lactosa presente en los productos lácteos a
25 los que se añade la composición o la célula hospedadora.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan la celulosa (enlaces beta-1,4-glucosídicos o beta D-glucosídicos), dando como resultado la formación de glucosa, celobiosa, celooligosacáridos y similares. Tradicionalmente, las
30 celulasas se han dividido en tres clases principales: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) ("EG), exoglucanasas o

celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) ("CBH") y beta-glucosidasas ([beta]-D-glucósido glucohidrolasa; EC 3.2.1.21) ("BG"). De acuerdo con una realización, el gen de la celulasa que está inactivado es bgLC endoglucanasa.

5 **Mananasa**

La mananasa es una enzima que descompone compuestos conocidos como mananos. Estos polisacáridos se construyen a partir del azúcar sencillo manosa y se encuentran ampliamente en la naturaleza. En muchas plantas (y por ejemplo, en sus semillas) los mananos sirven como reservas de carbohidratos. En un aspecto, la enzima se selecciona entre el grupo de las mananasas, en particular, las endo-beta-mananasas, estereasas, exomananasas y galactanasas. De acuerdo con una realización, el gen de mananasa que se inactiva es gmuG mananasa.

10

15

Pectinasa

La pectinasa es una enzima que descompone la pectina, un polisacárido encontrado en las paredes celulares vegetales. Citadas normalmente como enzimas pécticas, incluyen pectoliasa, pectozima y poligalacturonasa. Una de las pectinasas comerciales más estudiada y ampliamente usada es la poligalacturonasa. De acuerdo con una realización, el gen de pectinasa que se inactiva es pel pectato liasa.

20

25 **Amilasa**

La amilasa es una enzima que cataliza la hidrólisis del almidón en azúcares. La amilasa está presente en la saliva de los seres humanos y algunos otros mamíferos, donde comienza el proceso químico de la digestión. El páncreas y las glándulas salivales producen amilasa (alfa amilasa) para hidrolizar el almidón de la dieta en

30

disacáridos y trisacáridos que se convierten por otras enzimas en glucosa para proporcionar energía al organismo. Las plantas y algunas bacterias también producen amilasa. Las proteínas amilasas específicas se designan mediante diferentes letras griegas. Todas las amilasas son glucósido hidrolasas y actúan sobre los enlaces α -1,4-glucosídicos. La presente invención implica además preferentemente la inactivación de (EC 3.2.1.1) (CAS n.º 9014-71-5) (nombres alternativos: 1,4- α -D-glucan glucanohidrolasa; glucogenasa). De acuerdo con una realización, el gen de amilasa que se inactiva es amyE alfa-amilasa.

En un aspecto, el término "amilasa" tal como se usa en el presente documento se refiere a amilasas tales como [alfa]-amilasas (EC 3.2.1 .I), [beta]-amilasas (EC 3.2.1.2) y [gamma]-amilasas (EC 3.2.1.3.).

Grado de identidad

El grado de relación 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 búsqueda y una secuencia de referencia se determina 1) alineando las dos secuencias mediante un programa de alineamiento adecuado usando la matriz de puntuación por defecto y penalización por hueco por defecto, 2) identificando el número de coincidencias exactas, donde una coincidencia exacta es donde el programa de alineamiento ha identificado un aminoácido o nucleótido idéntico en las dos secuencias alineadas en una posición determinada en el alineamiento y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas con la longitud de la secuencia de referencia.

En una realización, el grado de identidad de secuencia entre una secuencia de búsqueda y una secuencia de referencia se determina 1) alineando las dos secuencias mediante un programa de alineamiento adecuado usando la
5 matriz de puntuación por defecto y penalización por hueco por defecto, 2) identificando el número de coincidencias exactas, donde una coincidencia exacta es donde el programa de alineamiento ha identificado un aminoácido o nucleótido idéntico en las dos secuencias alineadas en una posición
10 determinada en el alineamiento y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas con la longitud de la más larga de la dos secuencias.

En otra realización, el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de búsqueda y la secuencia de
15 referencia se determina 1) alineando las dos secuencias mediante un programa de alineamiento adecuado usando la matriz de puntuación por defecto y penalización por hueco por defecto, 2) identificando el número de coincidencias exactas, donde una coincidencia exacta es donde el programa
20 de alineamiento ha identificado un aminoácido o nucleótido idéntico en las dos secuencias alineadas en una posición determinada en el alineamiento y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas entre la "longitud de alineamiento", donde la longitud de alineamiento es la longitud del
25 alineamiento completo, incluyendo huecos y partes salientes de las secuencias.

Las comparaciones de identidad de secuencia pueden llevarse a cabo visualmente o más normalmente con la ayuda de programas de comparación de secuencia fácilmente
30 disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente usan complejos algoritmos de comparación

para alinear dos o más secuencias que reflejan mejor los acontecimientos evolutivos que pueden haber dado lugar a la o las diferencias entre las dos o más secuencias. Por lo tanto, estos algoritmos funcionan con un sistema de puntuación que recompensa el alineamiento de aminoácidos idénticos o similares y que penaliza la inserción de huecos, extensiones de huecos y el alineamiento de aminoácidos no similares. El sistema de puntuación de los algoritmos de comparación incluye:

10 i) asignación de una puntuación de penalización cada vez que se inserta un hueco (puntuación de penalización por hueco),

15 ii) asignación de una puntuación de penalización cada vez que se extiende un hueco existente con una posición adicional (puntuación de penalización por extensión),

15 iii) asignación de puntuaciones elevadas tras el alineamiento de aminoácidos idénticos, y

 iv) asignación de puntuaciones variables tras el alineamiento de aminoácidos no idénticos.

20 La mayoría de los programas de alineamiento permiten la modificación de las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa dicho programa informático para efectuar comparaciones de secuencias.

25 Las puntuaciones dadas para el alineamiento de aminoácidos no idénticos se asignan según una matriz de puntuación, también denominada matriz de sustitución. Las puntuaciones proporcionadas en dichas matrices de sustitución reflejan el hecho de que varía la probabilidad de que un aminoácido sea sustituido por otro durante la evolución y que esto depende de la naturaleza

30

física/química del aminoácido que se va a sustituir. Por ejemplo, la probabilidad de que se sustituya un aminoácido polar por otro aminoácido polar es mayor en comparación con su sustitución por un aminoácido hidrófobo. Por lo tanto, la matriz de puntuación asignará la máxima puntuación para aminoácidos idénticos, una puntuación menor para aminoácidos no idénticos pero similares y una puntuación aún más baja para aminoácidos no idénticos y no similares. Las matrices de puntuación más comúnmente usadas son las matrices PAM (Dayhoff et al. (1978), Jones et al. (1992)), las matrices BLOSUM (Henikoff y Henikoff (1992)) y la matriz Gonnet (Gonnet et al. (1992)).

Los programas informáticos adecuados para llevar a cabo dicho alineamiento incluyen, pero sin limitación, 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)). Se encuentra disponible una selección de diferentes herramientas de alineación a través del servidor de ExPASy Proteomics en la dirección www.expasy.org. Otro ejemplo de programa informático que puede efectuar el alineamiento de secuencias es BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineamiento local), que está disponible a través de la página web del National Center for Biotechnology Information que en la actualidad se encuentra en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y que se describió por primera vez en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. **215**; 403-410.

En una realización preferida de la presente invención, el programa de alineamiento realiza un programa de alineamiento global, que optimiza el alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias. En una realización

preferida adicional, el programa de alineamiento global está basado 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
5 sequence of two proteins", *Journal of Molecular Biology* **48** (3): 443-53). Los ejemplos de programas actuales que efectúan alineamientos globales usando el algoritmo de Needleman-Wunsch son los programas EMBOSS Needle y EMBOSS Stretcher, que están disponibles en
10 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>.

EMBOSS Needle efectúa un alineamiento de secuencia global óptimo usando el algoritmo de alineamiento de Needleman-Wunsch para hallar el alineamiento óptimo (incluyendo huecos) de dos secuencias a lo largo de su
15 longitud completa.

EMBOSS Stretcher emplea una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch que permite el alineamiento global de secuencias más grandes.

En una realización, las secuencias se alinean mediante
20 un programa de alineamiento global y la identidad de secuencia se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa divididas entre la "longitud de alineamiento", donde la longitud de alineamiento es la longitud del alineamiento
25 completo, incluyendo huecos y partes salientes de las secuencias.

En una realización adicional, el programa de alineamiento global usa el algoritmo de Needleman-Wunsch y la identidad de secuencia se calcula identificando el
30 número de coincidencias exactas identificadas por el programa divididas entre la "longitud de alineamiento",

donde la longitud de alineamiento es la longitud del alineamiento completo, incluyendo huecos y partes salientes de las secuencias.

En una realización adicional más, el programa de
5 alineamiento global se selecciona entre el 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
divididas entre la "longitud de alineamiento", donde la
10 longitud de alineamiento es la longitud del alineamiento
completo, incluyendo huecos y partes salientes de las
secuencias.

Una vez que el programa informático ha producido un
alineamiento, es posible calcular el % de similitud y el %
15 de identidad de secuencia. El programa efectúa esto
típicamente como parte de la comparación de secuencia y
genera un resultado numérico.

En una realización, se prefiere usar el programa
informático ClustalW para efectuar alineamientos de
20 secuencia. Preferentemente, el alineamiento con ClustalW se
efectúa con los siguientes parámetros para alineamiento por
parejas:

25	Matriz de sustitución:	Gonnet 250
	Penalización por hueco abierto:	20
	Penalización por extensión de hueco:	0.2
30	Penalización por final de hueco:	Ninguna

ClustalW2 se encuentra disponible, por ejemplo, en internet a través del European Bioinformatics Institute en la página web del EMBL-EBI www.ebi.ac.uk en herramientas - análisis de secuencia - ClustalW2. En la actualidad, la
5 dirección exacta de la herramienta ClustalW2 es www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2.

En otra realización, se prefiere usar el programa Align X en Vector NTI (Invitrogen) para efectuar alineamientos de secuencia. En una realización, puede
10 usarse Exp10 con configuraciones por defecto:

Penalización por apertura de hueco: 10

Penalización por extensión de hueco: 0.05

Intervalo de penalización por separación de hueco: 8

En otra realización, el alineamiento de una secuencia
15 de aminoácidos con o respecto de otra secuencia de aminoácidos se determina mediante el uso de la matriz de puntuación: `blosum62mt2` y las configuraciones de alineamientos por parejas de VectorNTI

Configuración K-tuple	1
20 Número de mejores diagonales	5
Tamaño de la ventana	5
Penalización por hueco	3
Penalización por apertura de hueco	10
Penalización por extensión de hueco	0,1

25

En una realización, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos con o sobre 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
30 sustitución que tiene actividad transgalactosilante.

Polipéptido

En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea 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
5 menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, o al menos 12 a una concentración de o superior al 3% p/p de concentración de lactosa inicial.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente
10 documento emplea un polipéptido en donde el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que contiene dominios
15 Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703) y/o Glyco_hydro 2C (PF02836).

En un aspecto, en el presente documento se divulga un polipéptido que contiene el dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532).

20 En un aspecto, en el presente documento se divulga un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionado entre el grupo que consiste en:

g. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de
25 secuencia con la SEQ ID NO: 1, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácido,

h. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, en donde dicho polipéptido
30 consiste en como máximo 975 restos de aminoácido,

i. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96.5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 1300 restos de aminoácido,

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

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

l. un polipéptido que comprende una eliminación, inserción y/o sustitución conservativa de uno o más restos
20 de aminoácido de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En otro aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene actividad transgalactosilante seleccionado entre el grupo que consiste en:

25 a. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96.5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 1300 restos de aminoácido,

b. un polipéptido que comprende una secuencia de
30 aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de

secuencia con la SEQ ID NO: 1, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácido,

c. un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones al menos de baja rigurosidad con

5 i) la secuencia de ácidos nucleicos comprendida en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifica el polipéptido de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5; o ii) la hebra complementaria de i),

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

e. un polipéptido que comprende una eliminación, inserción y/o sustitución conservativa de uno o más restos de aminoácido de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente
20 documento emplea un polipéptido, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de secuencia de al menos el 68%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto de la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

25 En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 90% respecto de la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 1.

30 En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene una identidad de

secuencia del 90% respecto de la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene una identidad de
5 secuencia del 96.5% respecto de la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 96.5% respecto de la secuencia de aminoácidos
10 madura de la SEQ ID NO: 4.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene una identidad de secuencia del 96.5% respecto de la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 5.

15 En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que procede de
20 *Bifidobacterium bifidum*.

En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene un pH óptimo de 6.5-7.5.

25 En un aspecto, la invención divulgada en el presente documento emplea un polipéptido que tiene una temperatura óptima de 30-60, tal como 42-60 grados Celsius.

Los polipéptidos que tienen actividad sobre los carbohidratos pueden clasificarse usando el sistema de
30 clasificación IUBMB basándose en su especificidad de sustrato o en la asignación CaZy en una de las 125 familias

de glucósido hidrolasa actuales. En la base de datos CaZy, la asignación se basa tanto en la secuencia como en la información estructural combinada con el conocimiento de estereoquímica de los sustratos y productos.

5 En el presente documento se divulga el uso de polipéptidos que cuando son un producto de expresión en una cepa hospedadora adecuada (por ejemplo, *Bacillus subtilis*) que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho polipéptido, es el único producto de
10 expresión de polipéptido de dicha secuencia de ácidos nucleicos que muestra actividad transgalactosilante. Esto puede evaluarse usando las siguientes técnicas conocidas por un experto en la materia. Las muestras que se van a evaluar se someten a SDS-PAGE y se visualizan usando un
15 colorante adecuado para la cuantificación de proteínas, tal como, por ejemplo, el sistema Bio-Rad Criterion. A continuación, se escanea el gel usando un escáner densimétrico adecuado, tal como, por ejemplo, el sistema Bio-Rad Criterion y se asegura que la imagen resultante se
20 encuentre en el intervalo dinámico. Las bandas correspondientes a cualquier variante/fragmento derivado de la SEQ ID NO: 8 se cuantifican y se calcula el porcentaje de los polipéptidos como: Porcentaje del polipéptido en
25 cuestión = polipéptido en cuestión / (suma de todos los polipéptidos que muestran actividad transgalactosilante) *100. El número total de variantes/fragmentos de polipéptidos derivados de la SEQ ID NO: 8 en la composición puede determinarse detectando los fragmentos derivados de
30 la SEQ ID NO: 8 mediante transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal mediante métodos conocidos para un experto en la materia.

El polipéptido divulgado en el presente documento comprende al menos dos dominios funcionales separados contenidos en la enzima. En primer lugar, el polipéptido debería contener un núcleo catalítico de glucósido hidrolasa como se describe a continuación. El núcleo catalítico debe pertenecer al clan GH-A de las familias de glucósido hidrolasa relacionadas. El clan GH-A se caracteriza por que escinde enlaces glucosídicos a través de un mecanismo de retención y posee un dominio catalítico que está basado en un plegamiento de barril TIM (Wierenga, 2001, FEBS Letters, 492(3), p 193-8). El dominio catalítico contiene dos restos de ácido glutámico que actúan como donantes de protones y nucleófilo, que emanan de las hebras 4 y 7 del domino de barril (Jenkins, 1995, FEBS Letters, 362(3), p 281-5). La estructura general del barril TIM es de 8 veces (β/α) que consiste en 8 hebras beta y 8 alfa-hélices. En un aspecto, el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa divulgado en el presente documento pertenece a las familias de glucósido hidrolasa GH-2 y -35, que son todas enzimas de barril TIM que pertenecen al clan GH-A. En un aspecto adicional, el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa pertenece a la familia GH-2 o GH-35. En un aspecto adicional, el núcleo catalítico de glucósido hidrolasa pertenece a la familia GH-2. Un denominador común es que estas enzimas se denominan enzimas de retención, por lo que se conserva la estereoquímica del sustrato en el producto (Henrissat, 1997, Curr Opin Struct Biol, 7(5), 637-44).

En un aspecto, los polipéptidos divulgados en el presente documento tienen actividad sobre enlaces de carbohidratos que tienen la conformación $\beta(1\rightarrow4)$. Esto sitúa

efectivamente a las enzimas en la clase EC 3.2.1.23 del IUBMB de β -galactosidasas. Esta actividad puede determinarse, pero sin limitación, utilizando sustratos sintéticos, tales como para-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (PNPG), orto-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (OPNG) o β -D-galactopiranosido con aglicones cromogénicos (XGal). Como forma alternativa para determinar si una enzima pertenece a la clase EC 3.2.1.23 de β -galactosidasas es incubar con un sustrato, tal como lactosa y medir la liberación de glucosa mediante un método, tal como determinación enzimática, HPLC, TLC u otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Para predecir las entidades funcionales de los polipéptidos pueden aplicarse varios repositorios disponibles públicamente, 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). Cabe destacar que cuando se efectúa dicho análisis, el análisis debe efectuarse sobre la secuencia de longitud completa del polipéptido disponible en bases de datos de repositorios públicos.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido que contiene uno o más dominios Pfam seleccionados entre: Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532). En otro aspecto adicional, se proporciona un polipéptido que contiene los dominios Pfam Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532). En otro aspecto adicional, se usa 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 usa un polipéptido como se divulga en el presente documento y que tiene la 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 a base de leche a 37°C y al 5 % en peso 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, los polipéptidos divulgados en el presente documento tienen una actividad transgalactosilante de tal forma que más del 20%, más del 30%, más del 40%, hasta el 50% de la lactosa inicial está transgalactosilada según se mide a una concentración de 100ppm en un ensayo a base de leche a 37°C y un 5 % p/p de lactosa después de 15, 30 o 180, tal como 180 minutos de reacción.

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

En un aspecto, la actividad de β -galactosidasa y/o la actividad transgalactosilante se miden a una concentración de 100ppm correspondiente a 2.13 LAU según se especifica en

el método 4. En términos generales, las unidades de actividad de la enzima pueden medirse según el ensayo divulgado en el documento WO 2003/186286 como método 4 y reproducido a continuación en la sección 4 de ejemplos.

5 En un aspecto adicional, los polipéptidos divulgados en el presente documento tienen una o más de las siguientes características:

a) una relación de actividad transgalactosilante:actividad de β -galactosidasa de al
10 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 a base de leche a 37°C y al 5 % en peso de lactosa después de 15, 30 o 180, tal como 180
15 minutos de reacción, y/o

b) tienen una actividad transgalactosilante de tal forma que más del 20%, más del 30%, más del 40% y hasta el 50% de la lactosa inicial se ha transgalactosilado según se mide a una concentración de 100ppm en un ensayo a base de
20 leche 37°C y un 5 % p/p de lactosa después de 15, 30 o 180, 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 la SEQ ID NO: 3, en
25 donde dicho polipéptido consiste en como máximo 1300 restos de aminoácido. 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 la SEQ ID NO: 1, tal como en donde dicha identidad de secuencia es
30 una identidad de secuencia de al menos el 95%, tal como, por ejemplo, de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos

el 98%, al menos el 99% o al menos el 100% y en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácido. En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que

5 tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 980 restos de aminoácido. En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%

10 respecto de la SEQ ID NO: 1, tal como en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, tal como, por ejemplo, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos

15 el 99% respecto de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, se proporciona un polipéptido que tiene al menos un 96,5% de identidad de secuencia respecto de la SEQ ID NO: 2, tal como en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 97%, tal como, por ejemplo, al

20 menos el 98% o al menos el 99% respecto de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, se proporcionan los polipéptidos divulgados en el presente documento que consisten en como máximo 975 restos de aminoácido, tal como, por ejemplo, como máximo 970 restos de aminoácido, tal como, como máximo 950 restos

25 de aminoácido, tal como, como máximo 940 restos de aminoácido, como máximo 930 restos de aminoácido, como máximo 920 restos de aminoácido, como máximo 910 restos de aminoácido, como máximo 900 restos de aminoácido, como máximo 895 restos de aminoácido o como máximo 890 restos de

30 aminoácido. En un aspecto, se proporciona un polipéptido particular que consiste en 887 o 965 restos de aminoácido.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, tal como en donde dicha identidad de secuencia es una identidad de secuencia de al menos el 98%, tal como, por ejemplo, de al menos el 99% o al menos el 100%, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 975 restos de aminoácido, tal como, por ejemplo, como máximo 970 o al menos 965 restos de aminoácido. En un aspecto, se usa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 975 restos de aminoácido.

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

En un aspecto adicional, se usa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96.5% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, tal como en donde dicha identidad de secuencia es una identidad de secuencia de al menos el 97%, tal como, por ejemplo, de al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 100%, en donde dicho polipéptido consiste en como máximo 1300 restos de aminoácido.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 98.5%, tal como al menos el 99% o al menos el 99.5% respecto de la SEQ ID NO: 5. En un aspecto, se

proporciona dicho polipéptido que consiste en como máximo 1290 restos de aminoácido, 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 aminoácido. En un aspecto preferido, se usa un polipéptido que consiste en 1211 restos de aminoácido.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 96%, tal como al menos el 97%, tal como, por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% respecto de la SEQ ID NO: 4. En un aspecto, se usa un polipéptido que consiste en como máximo 1210 restos de aminoácido, 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 aminoácido, tal como 1142 restos de aminoácido.

En un aspecto adicional, se proporciona un polipéptido en donde dicho polipéptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 96.5%, tal como al menos el 97%, tal como, por ejemplo, al menos el 98% o al menos el 99% respecto de la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, se proporciona un polipéptido que consiste en como máximo 1130 restos de aminoácido, tal 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 aminoácido. En un aspecto preferido, se usa un polipéptido que consiste en 1038 restos de aminoácido.

En un aspecto adicional, los polipéptidos divulgados en el presente documento tienen una relación de actividad

transgalactosilante por encima del 100%, tal como por encima del 150%, 175% o 200%.

En general, las proteínas están formadas por una o más regiones funcionales, denominadas comúnmente dominios. La presencia de diferentes dominios en diversas combinaciones en distintas proteínas da lugar al amplio 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 proteína 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. Guneseakaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman *Nucleic Acids Research* (2010) Edición de base de datos 38:D211-222. Cada familia está representada por múltiples alineamientos de secuencia y modelos de Markov escondidos (HMM). Los polipéptidos proporcionados en el presente documento contienen preferentemente 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, los polipéptidos proporcionados en el presente documento contienen los dominios Glyco_hydro2N (PF02837), Glyco_hydro (PF00703), Glyco_hydro 2C (PF02836) y el dominio similar a Ig bacteriano (grupo 4) (PF07532).

En un aspecto, los polipéptidos usados en el presente documento tienen una actividad de transgalactosilación útil frente a 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 el uso de polipéptidos que tienen cierto grado de identidad de secuencia o de

homología de secuencia respecto de las secuencias de aminoácidos definidas en el presente documento o respecto de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en el presente documento. La presente invención
5 abarca, en concreto, el uso de péptidos que tienen un grado de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, definidas más adelante u homólogos de las mismas.

La secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de
10 nucleótidos homóloga debe proporcionar y/o codificar un polipéptido que mantiene la actividad transgalactosilante funcional y/o potencia la actividad transgalactosilante en comparación con un polipéptido de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

15 En el presente contexto, se entiende que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 66%, 70%, 75%, 78%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica
20 a la secuencia en cuestión. Típicamente, el homólogo comprenderá los mismos sitios activos, etc. que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque también puede considerarse la homología en términos de similitud (es decir, restos de aminoácido que tienen
25 propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Por lo tanto, la presente invención también abarca el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier
30 secuencia de aminoácidos de una proteína o un polipéptido como se define en el presente documento, en particular

aquellas de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 definidas más adelante.

Las secuencias, en particular aquellas de variantes, homólogos y derivados de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5
5 definidas a continuación también pueden tener eliminaciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silente y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden efectuarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la
10 similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos en tanto que se mantenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico;
15 los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y
20 tirosina.

La presente invención también abarca sustituciones conservativas (sustitución y reemplazo se utilizan en el presente documento para referirse al intercambio de un resto de aminoácido existente por un resto alternativo) que
25 pueden producirse, es decir, sustitución de similar por similar, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede producirse una sustitución no conservativa, es decir, de una clase de resto a otra o como alternativa, que implica la inclusión de restos de
30 aminoácido no naturales, tales como ornitina (en lo sucesivo citada como Z), ácido diaminobutírico ornitina (en

lo sucesivo citada como B), norleucina ornitina (en lo sucesivo citada como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

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

En un aspecto, la secuencia de polipéptido empleada en la presente invención se encuentra en forma purificada.

En un aspecto, el polipéptido o la proteína para su uso en la presente invención se encuentra en una forma aislada.

En un aspecto, el polipéptido de la presente invención se produce de manera recombinante.

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

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

En un aspecto, los polipéptidos empleados en el presente documento comprenden una secuencia de aminoácidos

que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto de la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro codificado por la secuencia de nucleótidos que codifica la transgalactosilasa contenida en *Bifidobacterium bifidum* DSM20215 mostrada en el presente documento como la SEQ ID NO: 22. Todas las consideraciones y limitaciones referentes a las identidades de secuencia y la funcionalidad descrita en términos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 se aplican, cambiando lo que sea necesario, a las identidades de secuencia y la funcionalidad de los polipéptidos y nucleótidos.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de interés es la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 y la secuencia de nucleótidos de interés es preferentemente la SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

En un aspecto, el polipéptido es un fragmento que tiene uno o más (varios) aminoácidos eliminados respecto del extremo amino y/o carboxilo terminal del polipéptido de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5; en donde el fragmento tiene actividad transgalactosilante.

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

En un aspecto adicional, la longitud de la variante de polipéptido es de 500 a 1300 restos de aminoácido. En un aspecto adicional, la longitud de la variante de polipéptido es de 600 a 1300 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante de polipéptido es de 700 a 1300 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante de polipéptido es de 800 a 1300

aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante de polipéptido es de 800 a 1300 aminoácidos.

Para evaluar la expresión de una variante en una célula hospedadora, los ensayos pueden medir la proteína expresada, el ARNm correspondiente o la actividad de β -galactosidasa. Por ejemplo, los ensayos adecuados incluyen transferencia de Northern y de Southern, RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa) e hibridación *in situ* usando una sonda de hibridación marcada de manera adecuada. Los ensayos adecuados incluyen también medir la actividad en una muestra. Los ensayos adecuados de la actividad de la variante incluyen, pero sin limitación, ensayos basados en ONPG o la determinación de la glucosa en mezclas de reacción, tales como, por ejemplo, las descritas en los métodos y ejemplos en el presente documento.

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

En un aspecto, se usa una variante de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 que tiene una sustitución en una o más posiciones que afecta a una propiedad alterada, tal como transgalactosilación mejorada, en relación con las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. Dichos polipéptidos variantes se citan también en el presente documento por conveniencia como "polipéptido variante", "variante de polipéptido" o "variante". En un aspecto, los polipéptidos definidos en el presente documento tienen una actividad transgalactosilante mejorada en comparación con el polipéptido de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En otro aspecto, los polipéptidos definidos en el presente documento tienen una velocidad de reacción mejorada en comparación con el polipéptido de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

Los polipéptidos y los polipéptidos variantes usados en el presente documento comprenden actividad transgalactosilante.

5 En un aspecto, la relación de actividad transgalactosilante:actividad de β -galactosidasa es de al menos 0.5, tal como de al menos 1, tal como de al menos 1.5, o tal como de al menos 2 después de 30 min de reacción, tal como a una concentración inicial de lactosa superior al 3% p/p.

10 En un aspecto, la relación de actividad transgalactosilante:actividad de β -galactosidasa es de al menos 2.5, tal como de al menos 3, tal como de al menos 4, tal como de al menos 5, tal como de al menos 6, tal como de al menos 7, tal como de al menos 8, tal como de al menos 9,
15 tal como de al menos 10, tal como de al menos 11, o tal como de al menos 12 después de 30 min de reacción, tal como a una concentración inicial de lactosa superior al 3% p/p.

En un aspecto, los polipéptidos y las variantes definidas en el presente documento pueden obtenerse de
20 fuentes microbianas, en particular de hongos o levaduras filamentosas 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*;
25 *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
30 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* 10 *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*; *Pycnopus*, por ejemplo, *Pycnopus cinnabarinus*, *Pycnopus sanguineus*; 15 *Ruminococcus*, por ejemplo, *R. torques*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. violeceoruber*; *Trametes*; 20 *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 en el presente documento. 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 C-terminal. 25

En un aspecto, un polipéptido variante como se define en el presente documento incluye variantes en donde se han añadido o eliminado entre uno y aproximadamente 25 restos 30

de aminoácido respecto de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, un polipéptido variante como se define en el presente documento incluye variantes en donde se han añadido o eliminado entre uno y 25 restos de aminoácido respecto de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se ha sustituido cualquier número de aminoácidos entre uno y aproximadamente 25. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se ha sustituido cualquier número de aminoácidos entre tres y doce. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se ha sustituido cualquier número de aminoácidos entre cinco y nueve.

En un aspecto, se han sustituido al menos dos, en otro aspecto al menos tres y en otro aspecto más al menos cinco aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, los polipéptidos divulgados en el presente documento tienen la secuencia de 1, 2, 3, 4 o 5.

En un aspecto, los polipéptidos divulgados en el presente documento tienen la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, en donde se sustituyen y/o eliminan los 10, tal como 9, tal como 8, tal como 7, tal como 6, tal como 5, tal como 4, tal como 3, tal como 2, tal como 1 aminoácido en el extremo N-terminal.

Las enzimas y las variantes enzimáticas de las mismas pueden caracterizarse por sus secuencias de ácidos nucleicos y polipeptídica primaria, mediante modelado estructural tridimensional y/o por su actividad específica. Las características adicionales del polipéptido o las

variantes de polipéptido como se definen en el presente documento incluyen, por ejemplo, estabilidad, intervalo de pH, estabilidad a la oxidación y termoestabilidad. Los niveles de expresión y de actividad enzimática pueden evaluarse usando ensayos convencionales conocidos para el experto en este campo. En otro aspecto, las variantes muestran características de rendimiento mejoradas en relación con el polipéptido con las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, tal como estabilidad mejorada a elevadas temperaturas, por ejemplo, 65-85°C.

Se proporciona una variante de polipéptido como se define en el presente documento con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto del polipéptido de la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5.

Nucleótidos

En un aspecto, la presente invención emplea polipéptidos aislados que tienen actividad transgalactosilante como se ha indicado anteriormente que están codificados por polinucleótidos que hibridan en condiciones de muy baja rigurosidad, preferentemente condiciones de baja rigurosidad, más preferentemente condiciones de rigurosidad media, más preferentemente condiciones de rigurosidad media-alta, aún más preferentemente condiciones de alta rigurosidad y lo más preferentemente, condiciones de muy alta rigurosidad con i) la secuencia de ácidos nucleicos comprendida en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 que codifican el polipéptido maduro de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5; ii) la secuencia de ADNc de i) o iii) la hebra complementaria de i) o ii), (J.

Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). Una subsecuencia de la SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos
5 o preferentemente, al menos 200 nucleótidos contiguos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad de lactasa.

La secuencia de nucleótido de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 o una subsecuencia de la misma, así como la
10 secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 o un fragmento de la misma puede emplearse para diseñar una sonda de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad transgalactosilasa a partir de cepas de diferentes géneros
15 o especies de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, dichas sondas pueden usarse para su hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern convencionales, para identificar y aislar el gen
20 correspondiente en los mismos. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa pero deben tener al menos 14, preferentemente al menos 25, más preferentemente al menos 35 y lo más preferentemente al menos 70 nucleótidos de longitud. Sin embargo, se prefiere
25 que la sonda de ácido nucleico tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede ser de al menos 200 nucleótidos, preferentemente de al menos 300 nucleótidos, más preferentemente de al menos 400 nucleótidos o lo más
30 preferentemente de al menos 500 nucleótidos de longitud. Pueden usarse sondas incluso más largas, por ejemplo,

sondas de ácido nucleico de al menos 600 nucleótidos, preferentemente de al menos 700 nucleótidos, más preferentemente de al menos 800 nucleótidos, o lo más preferentemente de al menos 900 nucleótidos de longitud.

5 Pueden usarse sondas tanto de ADN como de ARN. Típicamente, las sondas están marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina). Dichas sondas están abarcadas por la presente invención.

10 Por lo tanto, puede explorarse una biblioteca de ADN genómico preparada a partir de dichos otros organismos respecto de AD que hibrida con las sondas descritas anteriormente y que codifica un polipéptido que tiene actividad de lactasa. Puede separarse ADN genómico o de
15 otro tipo de dichos otros organismos mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida o mediante otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede transferirse a e inmovilizarse sobre nitrocelulosa u otro material portador
20 adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo con las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13 o una subsecuencia de las mismas, se usa el material portador en una transferencia de Southern.

Para los fines de la presente invención, la
25 hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13, su hebra complementaria o una subsecuencia de la misma en condiciones de rigurosidad de muy baja a muy
30 elevada. Las moléculas con las que hibrida la sonda de

ácido nucleico en estas condiciones pueden detectarse usando una película de rayos X.

La sonda de ácido nucleico puede ser la región codificante madura de polipéptido de las SEQ ID NO: 9, 10,
5 11, 12 o 13.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de rigurosidad de muy baja a muy alta se definen como la prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0.3%, 200 g/ml de ADN de esperma de
10 salmón cizallado y desnaturalizado, y formamida al 25% para las rigurosidades muy bajas y bajas, formamida al 35% para las rigurosidades medias y medias-altas o formamida al 50% para las rigurosidades elevadas y muy elevadas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern convencionales,
15 óptimamente durante 12 a 24 horas.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando SSC 2X, SDS al 0.2%, preferentemente a al menos 45°C (rigurosidad muy
20 baja), más preferentemente a al menos 50°C (rigurosidad baja), más preferentemente a al menos 55°C (rigurosidad media), más preferentemente a al menos 60°C (rigurosidad media-alta), aún más preferentemente a al menos 65°C (rigurosidad elevada) y lo más preferentemente a al menos
25 70°C (rigurosidad muy elevada).

En una realización particular, el lavado se lleva a cabo usando SSC 0.2X, SDS al 0.2%, preferentemente a al menos 45°C (rigurosidad muy baja), más preferentemente a al menos 50°C (rigurosidad baja), más preferentemente a al
30 menos 55°C (rigurosidad media), más preferentemente a al menos 60°C (rigurosidad media-alta), aún más

preferentemente a al menos 65°C (rigurosidad elevada) y lo más preferentemente a al menos 70°C (rigurosidad muy elevada). En otra realización particular, el lavado se lleva a cabo usando SSC 0.1X, SDS al 0.2%, preferentemente a al menos 45°C (rigurosidad muy baja), más preferentemente a al menos 50°C (rigurosidad baja), más preferentemente a al menos 55°C (rigurosidad media), más preferentemente a al menos 60°C (rigurosidad media-alta), aún más preferentemente a al menos 65°C (rigurosidad elevada) y lo más preferentemente a al menos 70°C (rigurosidad muy elevada).

Para sondas cortas que tienen de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de rigurosidades se definen como prehibridación, hibridación y lavado poshibridación a de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_f calculada usando el cálculo de acuerdo con 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%, solución 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 de transferencia de Southern convencionales.

Para sondas cortas que tienen de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en SSC 6X más SDS al 0.1% durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos usando SSC 6X a de 5°C a 10°C por debajo de la T_f calculada.

En condiciones de hibridación que contienen sal, la T_f eficaz es aquella que controla el grado de identidad

necesario entre la sonda y el ADN unido al filtro para una hibridación satisfactoria. La T_f eficaz puede determinarse usando la fórmula a continuación para determinar el grado de identidad necesario para que dos ADN hibriden en

5 diversas condiciones de rigurosidad.

$$T_f \text{ eficaz} = 81.5 + 16.6(\log M[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.72(\% \text{ formamida})$$

(Véase

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

10 El contenido de G+C de la SEQ ID NO: 10 es del 42% y el contenido de G+C de la SEQ ID NO: 11 es del 44%. Para rigurosidad meda, la formamida está al 35% y la concentración de Na^+ para SSPE 5X es de 0.75 M.

Otra relación relevante es que un desemparejamiento

15 del 1% de dos ADN reduce la T_f en 1.4°C. Para determinar el grado de identidad necesario para que dos ADN hibriden en condiciones de rigurosidad media a 42°C, se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de homología} = 100 - [(T_f \text{ eficaz} - \text{temperatura de hibridación})/1.4]$$

20

(Véase

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

Los ácidos nucleicos variantes incluyen un polinucleótido que tiene un porcentaje determinado, por

25 ejemplo, un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia respecto del ácido nucleico que codifica las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido como se divulga en el presente documento. En un

30 aspecto adicional, el ácido nucleico divulgado en el presente documento tiene una secuencia de ácidos nucleicos

que es al menos un 60%, tal como al menos un 65%, tal como al menos un 70%, tal como al menos un 75%, tal como al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 99%
5 idéntica a las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

Puede usarse un plásmido que comprende un ácido nucleico como se describe en el presente documento.

Puede usarse un vector de expresión que comprende un ácido nucleico como se describe en el presente documento o
10 que es capaz de expresar un polipéptido como se describe en el presente documento.

Se proporciona un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de polipéptido definidas en el presente documento expuestas en
15 el presente documento. Además, se proporciona un ácido nucleico capaz de hibridar con el complemento. En otra realización, la secuencia para su uso en los métodos y composiciones aquí descritos es una secuencia sintética. Esta incluye, pero sin limitación, secuencias producidas
20 con un uso de codones óptimo para su expresión en organismos hospedadores, tales como levaduras.

Las variantes de polipéptido proporcionadas en el presente documento pueden producirse sintéticamente o mediante expresión recombinante en una célula hospedadora,
25 según procedimientos de sobra conocidos en la técnica. En un aspecto, los polipéptidos divulgados en el presente documento son polipéptidos recombinantes. La variante de polipéptido expresada definida en el presente documento se aísla opcionalmente antes de su uso.

30 En otra realización, la variante de polipéptido como se define en el presente documento se purifica después de

la expresión. Los métodos de modificación genética y de producción recombinante de variantes de polipéptido se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 7.371.552, 7.166.453; 6.890.572; y 6.667.065; y en las Solicitudes Publicadas de los Estados Unidos n.º 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 divulgaciones, incluyendo secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos, cebadores, vectores, métodos de selección, células hospedadoras, purificación y reconstitución de variantes polipeptídicas expresadas y la caracterización de variantes de polipéptidos como se definen en el presente documento, incluyendo los tampones, intervalos de pH, concentraciones de Ca^{2+} , concentraciones de sustrato y concentraciones enzimáticas útiles para ensayos enzimáticos se incorporan al presente documento por referencia.

Se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 o una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto de un ácido nucleico que codifica la proteína de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 60%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto del ácido nucleico de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

Vectores

En un aspecto, la invención emplea un vector que comprende un polinucleótido. En un aspecto, una célula bacteriana comprende el vector. En algunas realizaciones, se transfiere a una célula hospedadora una construcción de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante en un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras unidas operablemente a una secuencia codificante. El vector puede ser cualquier vector que pueda integrarse en un genoma de célula hospedadora fúngica y replicarse cuando se introduce en la célula hospedadora. El catálogo de cepas FGSC, Universidad de Missouri, contiene una lista de vectores adecuados. Se proporcionan ejemplos adicionales de vectores de expresión y/o integración adecuados en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001); Bennett et al., MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991), págs. 396-428; y en la Patente de los Estados Unidos n.º 5,874,276. Los vectores ilustrativos incluyen pFB6, pBR322, PUC18, pUC100 y pENTR/D, pDONTM201, pDONRTM221, pENTRTM, pGEM[®]3Z y pGEM[®]4Z. Los ejemplos para su uso 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, se une operablemente un ácido nucleico que codifica una variante a un promotor adecuado, que permite la transcripción en la célula hospedadora. El promotor puede proceder de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas para la célula hospedadora. Los ejemplos no limitantes adecuados de promotores incluyen los promotores *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*.

En una realización, el promotor es uno que es nativo para la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando el hospedador es *P. saccharophila*, el promotor es un promotor nativo de *P. saccharophila*. Un "promotor inducible" es un promotor que
5 es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. En otra realización, el promotor es uno que es heterólogo para la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, la secuencia codificante se une operablemente a una secuencia de ADN que codifica una
10 secuencia de señal. En otro aspecto, un péptido de señal representativo es la SEQ ID NO: 27. Un péptido de señal representativo es la SEQ ID NO: 9 que es la secuencia de señal nativa del precursor *aprE* de *Bacillus subtilis*. En otras realizaciones, se reemplaza el ADN que codifica la
15 secuencia de señal con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal de otros precursores de *Bacillus subtilis* extracelulares. En una realización, el polinucleótido que codifica la secuencia de señal se encuentra inmediatamente cadena arriba y en fase con el
20 polinucleótido que codifica el polipéptido. La secuencia de señal puede seleccionarse de la misma especie que la célula hospedadora.

En realizaciones adicionales, una secuencia de señal y una secuencia de promotor que comprende una construcción o
25 vector de ADN que se va a introducir en una célula hospedadora fúngica proceden de la misma fuente. En algunas realizaciones, el vector también incluye una secuencia de terminación. En una realización, la secuencia de terminación y la secuencia promotora proceden de la misma
30 fuente. En otra realización, la secuencia de terminación es homóloga para la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, un vector de expresión incluye un marcador de selección. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados incluyen aquellos que confieren resistencia a agentes antimicrobianos, por ejemplo, higromicina o fleomicina. Los marcadores de selección nutricional también son adecuados e incluyen *amdS*, *argB* y *pyr4*. En una realización, el marcador de selección 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 de selección se describe en Kelley et al., *EMBO J.* 4: 475-479 (1985) y en 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 manera autónoma en un organismo hospedador dado o de integrarse en el ADN del hospedador. 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 del gen que se va a expresar. En algunas realizaciones, se logra el truncamiento génico eliminando secuencias de ADN no deseadas para dejar el dominio que se va a expresar bajo el control de sus propias secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales. El segundo tipo de vector de expresión está preensamblado y contiene secuencias necesarias para la transcripción a alto nivel y un marcador de selección. En algunas realizaciones, la

región codificante para un gen o una parte del mismo se inserta en este vector de expresión de uso general, de tal forma que se encuentra bajo el control transcripcional de las secuencias promotoras y terminadoras de la construcción de expresión. En algunas realizaciones, se insertan genes o partes de los mismos cadena abajo del promotor fuerte *cbh1*.

Hospedadores de expresión/células hospedadoras

En un aspecto adicional, se usa una célula hospedadora que comprende, preferentemente transformada con, un plásmido como se describe en el presente documento o un vector de expresión como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, se usa una célula capaz de expresar un polipéptido como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la célula hospedadora como se describe en el presente documento o la célula como se describe en el presente documento es una célula bacteriana, fúngica o de levadura.

En un aspecto adicional, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torula*, *Torulopsis* y *Aspergillus*.

En un aspecto adicional, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en *Ruminococcus hansenii*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Lactococcus lactis*.

En otra realización, las células hospedadoras adecuadas incluyen una bacteria grampositiva seleccionada entre el grupo que consiste en *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*,
5 *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces lividans*, o *S. murinus*; o una bacteria gramnegativa, en donde dicha bacteria gramnegativa es *Escherichia coli* o una especie de *Pseudomonas*. En un aspecto, la célula
10 hospedadora es *B. subtilis* o *B. licheniformis*. En una realización, la célula hospedadora es *B. subtilis* y la proteína expresada se diseña por ingeniería genética para que comprenda una secuencia de señal de *B. subtilis*, tal como se expone en más detalle más adelante.

15 En algunas realizaciones, se modifica por ingeniería genética una célula hospedadora para que exprese una variante de polipéptido como se define en el presente documento con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente un 66%, 68%, 70%, 72%,
20 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto del polipéptido de la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica una variante de polipéptido como se define en el presente documento tendrá una secuencia de ácidos
25 nucleicos que codifica la proteína de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 o una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto de un ácido nucleico que codifica la
30 proteína de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos tiene una

identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 60%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% respecto del ácido nucleico de las SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 o 13.

5 **Mutagénesis**

Puede obtenerse una célula hospedadora deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa o una célula hospedadora en la que estas enzimas se encuentran esencialmente inactivas mediante ingeniería genética usando técnicas de manipulación genética recombinate, sometiendo al hospedador a mutagénesis o ambas. La modificación o inactivación de los genes que codifican la celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente la amilasa de la presente invención puede ser el resultado de someter a las células parentales a mutagénesis y seleccionar respecto de células mutantes en las que se ha reducido la capacidad para expresar estas enzimas, en comparación con la célula parental. La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, puede efectuarse, por ejemplo, mediante el uso de un agente mutagenizante físico o químico adecuado, mediante el uso de un oligonucleótido adecuado o sometiendo a la secuencia de ADN a mutagénesis generada por la PCR. Además, la mutagénesis puede efectuarse mediante el uso de cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes.

Los ejemplos de un agente mutagenizante químico o físico adecuado para el presente fin incluyen radiación gamma o ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, sulfonato de etilmetano (EMS), bisulfito sódico, ácido fórmico y análogos de nucleótidos. Cuando se usan

dichos agentes, la mutagénesis se lleva a cabo típicamente incubando la célula parental que se va a someter a mutagénesis en presencia del agente mutagenizante seleccionado en condiciones adecuadas y seleccionando respecto de células mutantes que muestran expresión reducida del gen. Como alternativa, dichas cepas pueden aislarse usando técnicas genéticas, tales como hibridación o emparejamiento y fusión de protoplastos o cualquier otra técnica genética clásica para inducir diversidad genética.

La cepa deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa puede seleccionarse posteriormente controlando el nivel de expresión de las enzimas. Opcionalmente, la cepa deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente amilasa se selecciona posteriormente midiendo el nivel de expresión de un gen de interés dado que se va a expresar en la célula hospedadora. La selección de cepas que tienen actividad enzimática reducida puede efectuarse midiendo directamente la actividad enzimática en caldo de cultivo, en sobrenadante de cultivo, en células permeabilizadas o en lisados celulares.

Técnicas de ADN recombinante

Como alternativa, pueden construirse células hospedadoras que tienen una cantidad reducida de actividad de celulasa, mananasa y pectinasa, y opcionalmente actividad de amilasa o una célula hospedadora en la que estas enzimas están esencialmente inactivas usando tecnología de ADN recombinante. En la técnica se describen varias técnicas de inactivación o interrupción génica, tales como interrupción de genes en un paso, inserción de marcador, mutagénesis de sitio dirigido, eliminación,

interferencia de ARN, ARN antisentido y otras y todas pueden usarse para reducir, inhibir o alterar la síntesis de la actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa para obtener una cepa de
5 producción industrial con actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa reducida. Asimismo, la inactivación de la celulasa, la mananasa y la pectinasa y opcionalmente de la amilasa mediante la alteración de las secuencias de control que dirigen la expresión del gen de
10 la celulasa, la mananasa y la pectinasa y opcionalmente de la amilasa forman parte de la presente invención. Un ejemplo de la misma es la reducción de la actividad del promotor mediante interrupción génica.

Usando modernas técnicas de modificación genética, se
15 puede obtener una cepa recombinante deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa, preferentemente alterando un gen que codifica la actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa, más preferentemente insertando un gen marcador
20 en un gen que codifica la actividad de la enzima, más preferentemente eliminando una parte o la totalidad de la región codificante de la enzima del genoma. Los métodos para llevar a cabo dichas inactivaciones génicas se han descrito para varios microorganismos diferentes y son
25 conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, el documento EP357127). La expresión de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa en la célula mutante puede por tanto reducirse o eliminarse. Dependiendo de la cepa hospedadora que se modifica usando
30 estas técnicas, puede repetirse el procedimiento varias veces para eliminar la totalidad o la mayor parte de las

secuencias codificantes de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa.

La modificación o inactivación de genes del hospedador, tales como los de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa puede llevarse a cabo mediante técnicas antisentido establecidas usando una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos del gen. Más específicamente, puede reducirse o eliminarse la expresión del gen introduciendo una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos que puede transcribirse en la célula y que es capaz de hibridar con el ARNm producido en la célula. En condiciones que permiten que la secuencia de nucleótidos complementaria antisentido hibride con el ARNm, se reduce o elimina la cantidad de proteína traducida. Los ejemplos de expresión de un ARN antisentido se proporcionan por Ngiam et al. (*Appl. Environ. Microbiol.* 66:775-782, 2000) y Zrenner et al. (*Planta* 190:247-252, 1993).

La modificación, regulación negativa o inactivación de un gen hospedador puede lograrse mediante técnicas de interferencia de ARN (iARN) (*FEMS Microb. Lett.* 237:317-324, 2004). Más específicamente, puede reducirse o eliminarse la expresión del gen por una célula fúngica filamentosa clonando porciones con sentido y antisentido idénticas de la secuencia de nucleótidos, cuya expresión va a verse afectada, una detrás de la otra con un nucleótido espaciador entre ellas, insertándola en un vector de expresión e introduciendo el vector de expresión en la célula, en donde puede transcribirse ARN bicatenario (ARNbc) y después procesarse en ARNpi más corto que es capaz de hibridar con el ARNm diana. Después de que se haya

transcrito el ARNbc, la formación de pequeños fragmentos (21-23) nucleotídicos de ARNbc dará lugar a una degradación dirigida del ARNm, que se verá afectado. La eliminación del ARNm específico puede ser en diversos grados. Pueden
5 emplearse las técnicas de interferencia de ARN descritas en los documentos WO 2005/05672 y WO 2005/026356 para la modificación, regulación negativa o inactivación del gen del hospedador.

La célula hospedadora deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa que se ha
10 modificado o inactivado mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente y que produce menos actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa que la célula parental cuando se cultiva en condiciones
15 idénticas y se mide usando los mismos ensayos a los descritos anteriormente, puede portar otra secuencia de nucleótidos.

Dichas cepas de producción industrial con actividad reducida de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente
20 de amilasa aisladas o construidas mediante técnicas genéticas clásicas o tecnología de ADN recombinante pueden usarse para procesos industriales relevantes que requieren que el producto final contenga fibras dietéticas. Preferentemente, estas cepas se usan para la producción de
25 la enzima industrialmente relevante que tiene actividad transgalactosilante. Más preferentemente, estas cepas se usan para la producción de enzimas que se usan en la industria alimentaria; aún más preferentemente, estas enzimas se usan en el procesado de productos lácteos. Más
30 preferentemente, dichas cepas de producción industrial con actividad reducida de celulasa, mananasa y pectinasa y

opcionalmente de amilasa se usan para la producción de GOS a partir de lactosa.

Preferentemente, las células hospedadoras deficientes para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa de la invención son cepas que tienen menos de un 50% de la actividad detectable intracelular o extracelular de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa, según se detecta en una reacción modelo (véase la información experimental en los ejemplos 2, 3 o 4). Más preferentemente, las cepas deficientes para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa de la invención son cepas que tienen menos de un 50% de la actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa. Más preferentemente, las cepas deficientes para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa de la invención son cepas que tienen una actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa que es menor del 25% de la actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa de la célula hospedadora de la que proceden, según se detecta en una reacción modelo; preferentemente menos de un 10%, más preferentemente menos de un 5%, más preferentemente menos de un 1% y lo más preferentemente, la actividad de celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente de amilasa es indetectable en las células hospedadoras deficientes de la invención.

Los expertos en la materia conocen una gran variedad de sistemas para la detección de polipéptidos. Los sistemas de detección incluyen cualquier ensayo posible para la detección de la actividad de polipéptidos o enzimática. A modo de ejemplo, estos sistemas de ensayo incluyen, pero

sin limitación, ensayos basados en colorimetría, fotometría, fluorometría, turbidimetría, viscosimetría, inmunología, biología, cromatografía y otros ensayos disponibles.

5 Preferentemente, en caso de que el polipéptido producido sea una enzima, se determina la cantidad de enzima activa producida midiendo su actividad en una reacción modelo (véanse los ejemplos 2, 3 o 4).

10 De acuerdo con una realización preferida adicional, la célula hospedadora deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa de la invención se caracteriza por el hecho de que cuando esta cepa se ha transformado con una construcción de expresión que comprende un gen que codifica un polipéptido que tiene
15 actividad transgalactosilante, dicha cepa produce al menos la cantidad del polipéptido que produciría la cepa de tipo silvestre de la que se origina en las mismas condiciones de cultivo, cuando la cepa de tipo silvestre también se ha transformado con la misma construcción de expresión que la
20 célula hospedadora deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa.

25 Preferentemente, las cepas deficientes para celulasa, mananasa y pectinasa y opcionalmente para amilasa de la invención son cepas que producen la misma cantidad o más del polipéptido que tiene actividad transgalactosilante que la cepa de tipo silvestre de la que proceden en las mismas condiciones de cultivo. Más preferentemente, la cepa deficiente para celulasa, mananasa y pectinasa y
30 opcionalmente para amilasa produce más de este polipéptido dado que la cepa de tipo silvestre de la que procede en las mismas condiciones de cultivo.

Producción de polipéptido que tiene actividad transgalactosilante

De acuerdo con otra realización más, la presente invención se refiere a métodos para transcribir una
5 secuencia de nucleótidos en una célula hospedadora deficiente para actividad de celulasa, mananasa, pectinasa y/o amilasa, en donde la secuencia transcrita codifica el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante que comprende:

- 10 (a) cultivar, en un medio de cultivo, la célula hospedadora de la invención que comprende (i) un promotor, (ii) una secuencia de nucleótidos cadena abajo que codifica el polipéptido, (iii) una señal de parada traduccional y (iv) una señal de parada transcripcional,
- 15 (b) expresar el polipéptido en la célula hospedadora, y
- (c) opcionalmente, recuperar el polipéptido del medio de cultivo o de la célula hospedadora.

La cepa deficiente se produce preferentemente de
20 acuerdo con el método de la presente invención. La cepa deficiente puede cultivarse o mantenerse en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido deseado usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden sembrarse en un sustrato
25 sólido, agitarse en un matraz, cultivarse en fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, discontinua, discontinua alimentada o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permiten que el
30 polipéptido se exprese y/o se aísle. El cultivo se produce en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de

carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, Bennett y LaSure, eds., *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Hay disponibles medios de
5 proveedores comerciales o pueden prepararse usando composiciones publicadas (*por ejemplo*, en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). En caso de que el polipéptido se secrete al medio nutriente, puede recuperarse el polipéptido directamente del medio. En caso
10 de que el polipéptido no se secrete, puede recuperarse de lisados celulares.

El polipéptido resultante puede aislarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede aislarse el polipéptido del medio nutriente mediante
15 procedimientos convencionales que incluyen, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Posteriormente, puede purificarse adicionalmente el polipéptido aislado mediante una diversidad de
20 procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitación, cromatografía (*por ejemplo*, de intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco o exclusión por tamaño), electroforesis (*por ejemplo*, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (*por ejemplo*,
25 precipitación con acetona o sulfato de amonio) o extracción (*por ejemplo*, caótopo, sal o pH). Véase, *por ejemplo*, Janson y Ryden, eds., *Protein Purification*, VCH Publishers, Nueva York, 1989.

El polipéptido puede detectarse usando métodos
30 conocidos en la técnica que son específicos para el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante. Estos

métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, la desaparición de un sustrato enzimático o SDS-PAGE. Por ejemplo, puede usarse un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido. Se conocen en la técnica procedimientos para determinar la actividad enzimática para varias enzimas.

Métodos para producir polipéptidos

En un aspecto adicional, un método para expresar un polipéptido como se describe en el presente documento comprende obtener una célula hospedadora o una célula como se describe en el presente documento y expresar el polipéptido que tiene actividad transgalactosilante a partir de la célula o la célula hospedadora y opcionalmente purificar el polipéptido. Dicho polipéptido puede usarse en la presente invención.

Transformación, expresión y cultivo de células hospedadoras

La introducción de una construcción de ADN o un vector en una célula hospedadora incluye técnicas, tales como transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, por ejemplo, transfección mediada por lipofección y mediada por DEAE-Dextrano; incubación con fosfato de calcio y precipitado de ADN; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN; y fusión de protoplastos. Las técnicas generales de transformación se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo., Ausubel et al. (1987), anteriormente citado, capítulo 9; Sambrook et al. (2001), anteriormente citado; y Campbell et al., Curr. Genet. 16: 53-56 (1989).

Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para seleccionar transformantes.

Métodos de inmovilización y formulación de los polipéptidos y composiciones de polipéptidos

5 Las composiciones de polipéptidos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de un granulado o microgranulado. El polipéptido que se va a
10 incluir en la composición puede estabilizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Aplicaciones

A continuación se proporcionan ejemplos de usos preferidos de los polipéptidos o las composiciones de
15 polipéptido de la invención.

En un aspecto, en el presente documento se divulga un método para producir un producto alimentario mediante el tratamiento de un sustrato que comprende lactosa con un polipéptido o una composición de polipéptido como se
20 describe en el presente documento.

En un aspecto, en el presente documento se divulga un método para producir un producto lácteo mediante el tratamiento de un sustrato que comprende lactosa con un polipéptido o una composición de polipéptido como se
25 describe en el presente documento.

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

La preparación enzimática, tal como en forma de un ingrediente alimentario preparado de acuerdo con la
30 presente invención, puede estar en forma de una solución o en forma de un sólido, dependiendo del uso y/o del modo de

aplicación y/o del modo de administración. El sólido puede encontrarse en forma de un polvo enzimático seco o en forma de una enzima granulada.

Los ejemplos de formulaciones enzimáticas secas incluyen productos secados por pulverización, productos granulados mezclados, productos laminados, tales como gránulos de lecho fluido, gránulos extruidos o granulados, productos comprimidos, productos liofilizados.

La preparación enzimática, tal como en forma de un ingrediente alimentario preparado de acuerdo con la presente invención, puede estar en forma de una solución o en forma de un sólido, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración. El sólido puede encontrarse en forma de un polvo enzimático seco o en forma de una enzima granulada.

En un aspecto, se proporciona una composición, preferentemente una composición alimentaria, más preferentemente, un producto lácteo que comprende un célula o un polipéptido o una composición de polipéptido, como se describe en el presente documento.

Además, en el presente documento se divulga una composición que comprende al menos un 5%, tal como, por ejemplo, un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% p/p de uno o más polipéptidos como se divulgan en el presente documento basándose en la cantidad total de polipéptidos en la composición que tiene al menos un 70%, tal como, por ejemplo, un 72%, 74%, 74%, 78%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22. Esto puede evaluarse usando las siguientes técnicas conocidas por un experto en la materia. Las muestras que se van a evaluar se someten a SDS-PAGE y se visualizan usando un colorante

adecuado para la cuantificación de proteínas, tal como, por ejemplo, el sistema Bio-Rad Criterion. A continuación, se escanea el gel usando un escáner densimétrico adecuado, tal como, por ejemplo, el sistema Bio-Rad Criterion y se asegura que la imagen resultante se encuentre en el intervalo dinámico. Las bandas correspondientes a cualquier variante/fragmento derivado de la SEQ ID NO: 8 se cuantifican y se calcula el porcentaje de los polipéptidos como: Porcentaje del polipéptido en cuestión = polipéptido en cuestión/(suma de todos los polipéptidos que muestran actividad transgalactosilante) *100. El número total de variantes/fragmentos de polipéptidos derivados de la SEQ ID NO: 8 en la composición puede determinarse detectando los fragmentos derivados de la SEQ ID NO: 8 mediante transferencia de Western usando un anticuerpo policlonal mediante métodos conocidos para un experto en la materia.

En un aspecto, la composición de acuerdo con la presente invención comprende uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5. En un aspecto adicional, la composición comprende uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. En un aspecto adicional más, la composición comprende uno o más polipéptidos seleccionados entre el grupo que consiste en un polipéptido que consiste en las SEQ ID NO: 1 y 2.

En un aspecto, la invención proporciona una preparación enzimática compleja que comprende el complejo de enzima de acuerdo con la invención, un portador de enzima y opcionalmente un estabilizante y/o un conservante.

en un aspecto adicional más de la invención, el portador de enzima se selecciona entre el grupo que consiste en glicerol o agua. En una realización, el portador de enzima no comprende un poliol (por ejemplo, 5 glicerol, propilenglicol o sorbitol).

En un aspecto adicional, la preparación/composición comprende un estabilizante. En un aspecto, el estabilizante se selecciona entre el grupo que consiste en sales inorgánicas, polioles, azúcares y combinaciones de los 10 mismos. En un aspecto, el estabilizante es una sal inorgánica, tal como cloruro potásico. En otro aspecto, el poliol es glicerol, propilenglicol o sorbitol. En otro aspecto, el estabilizante no es un poliol, tal como glicerol, propilenglicol o sorbitol. En otro aspecto más, 15 el azúcar es un carbohidrato de molécula pequeña, en particular, cualquiera de los diversos que tienen sabor dulce, tales como glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa.

En un aspecto adicional más, la preparación comprende un conservante. En un aspecto, el conservante es metil 20 parabeno, propil parabeno, benzoato, sorbato u otros conservantes aprobados para alimentos o una mezcla de los mismos.

El método de la invención puede ponerse en práctica con enzimas inmovilizadas, por ejemplo, una lactasa 25 inmovilizada u otras enzimas productoras de galactooligosacárido. La enzima puede inmovilizarse sobre cualquier soporte orgánico o inorgánico. Los soportes inorgánicos incluyen alúmina, celite, Dowex-1-cloruro, perlas de vidrio y gel de sílice. Los soportes orgánicos 30 ejemplares incluyen DEAE-celulosa, hidrogeles de alginato, perlas de alginato o equivalentes. En varios aspectos de la

invención, la inmovilización de la lactasa puede optimizarse mediante adsorción física sobre el soporte inorgánico. Las enzimas usadas para poner en práctica la invención pueden inmovilizarse en diferentes medios, 5 incluyendo agua, tampón de Tris-HCl y solución tamponada 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 10 un producto lácteo mediante el tratamiento de un sustrato a base de leche que comprende lactosa con un polipéptido o una composición de polipéptido como se describe en el presente documento. En un aspecto adicional, se proporciona un método para producir un producto lácteo mediante el 15 tratamiento de un sustrato a base de leche que comprende lactosa con un polipéptido que tiene una actividad relativa de transgalactosilación por encima del 60%, tal como por encima del 70%, tal como por encima del 75% después de 15 min. de reacción. En un aspecto, la actividad relativa de transgalactosilación es por encima de 3 después de 30 min. 20 de reacción. En un aspecto adicional, la actividad relativa de transgalactosilación es por encima de 6 después de 30 min. de reacción. En un aspecto adicional más, la actividad relativa de transgalactosilación es por encima de 12 25 después de 30 min. de reacción. En un aspecto, se proporciona un método, en donde el tratamiento con un polipéptido o una composición de polipéptido como se describe en el presente documento se produce a una temperatura óptima para la actividad de la enzima. En un 30 aspecto adicional, el polipéptido o la composición de polipéptido se añade al sustrato a base de leche a una

concentración de 0.01-1000 ppm. En un aspecto adicional más, el polipéptido o la composición de polipéptido se añade al sustrato a base de leche a una concentración de 0.1-100 ppm. En un aspecto adicional, el polipéptido o la composición de polipéptido se añade al sustrato a base de leche a una concentración de 1-10 ppm. En un aspecto, se proporciona un método que comprende además fermentar 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 o la composición de polipéptido y el microorganismo se efectúa esencialmente al mismo tiempo. En un aspecto, el polipéptido o la composición de polipéptido y el microorganismo se añaden al sustrato a base de leche esencialmente al mismo tiempo.

En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende un célula o un polipéptido o una composición de polipéptido, como se describe en el presente documento. En un aspecto, el polipéptido o la composición de polipéptido como se define en el presente documento se añade a una concentración de 0.01-1000 ppm.

En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende GOS formado *in situ* mediante un polipéptido o una composición de polipéptido como se define en el presente documento. En un aspecto, se proporciona un producto lácteo que comprende una célula como se define en el presente documento.

Un producto lácteo como se describe en el presente documento puede ser, por ejemplo, leche descremada, leche baja en grasa, leche entera, nata, leche UHT, leche que tiene una vida útil prolongada, un producto lácteo

fermentado, queso, yogur, mantequilla, productos untables lácteos, suero de la leche, bebida láctea acidificada, crema agria, bebida a base de suero de leche, helado, leche condensada, dulce de leche o una bebida láctea aromatizada.

5 Un producto lácteo puede fabricarse mediante cualquier método conocido en la técnica.

Además, un producto lácteo puede comprender componentes no lácteos, por ejemplo, componentes vegetales, tales como, por ejemplo, aceite vegetal, proteína vegetal
10 y/o carbohidratos 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, jugos de fruta o
15 cualquier otro componente conocido en la técnica como componente de o como aditivo para un producto lácteo.

En una realización de la invención, uno o más componentes de la leche y/o fracciones lácteas suponen al menos un 50% (peso/peso), tal como al menos un 70%, por
20 ejemplo, al menos un 80%, preferentemente al menos un 90% del producto lácteo.

En una realización de la invención, uno o más sustratos a base de leche que se han tratado con una enzima como se define en el presente documento que tienen
25 actividad transgalactosilante suponen al menos un 50% (peso/peso), tal como al menos un 70%, por ejemplo, al menos un 80%, preferentemente al menos un 90% del producto lácteo.

En una realización de la invención, el producto lácteo
30 es un producto lácteo que no está enriquecido mediante la adición de galactooligosacáridos preproducidos.

En una realización de la invención, el sustrato a base de leche tratado con polipéptido no se seca antes de su uso como ingrediente en el producto lácteo.

5 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 de grasa completa, helado bajo en grasa o helado a base de yogur u otros productos lácteos fermentados. El helado puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica.

10 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 se ha sometido a un proceso de esterilización que tiene como objeto eliminar todos los microorganismos, incluyendo las esporas bacterianas. El tratamiento UHT (ultra alta temperatura) puede ser, por ejemplo, tratamiento por calor durante 30 segundos a 130°C o tratamiento por calor durante un segundo a 145°C.

20 En una realización preferida de la invención, el producto lácteo es leche ESL. La leche ESL en el presente contexto es leche que tiene una vida útil extendida debido al tratamiento de microfiltración y/o por calor y que es capaz de permanecer fresca durante al menos 15 días, preferentemente durante al menos 20 días en el estante del comercio a 2-5°C.

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

30 Los microorganismos usados para la mayor parte de los productos lácteos fermentados se seleccionan entre el grupo

de bacterias citadas generalmente como bacterias del ácido láctico. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "bacteria del ácido láctico" indica una bacteria grampositiva, microaerófila o anaerobia que fermenta azúcares con la producción de ácidos, incluyendo ácido láctico como ácido producido de manera predominante, ácido acético y ácido propanoico. Las bacterias del ácido láctico más útiles desde el punto de vista industrial pertenecen al orden "Lactobacillales" que incluye *Lactococcus* spp.,
5 *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp.,
10 *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. y *Propionibacterium* spp. Además, las bacterias productoras de ácido láctico que pertenecen al grupo de bacterias anaerobias, las bifidobacterias, es decir, *Bifidobacterium* spp., que se usan frecuentemente como cultivos alimentarios solas o en combinación como bacterias del ácido láctico, se incluyen generalmente en el grupo de las bacterias del ácido láctico.

Las bacterias del ácido láctico se suministran normalmente a la industria láctea en forma de cultivos congelados o criodesecados para la propagación iniciadora en bruto o los denominados cultivos "de inoculación directa" (DVS) para la inoculación directa en un vaso o vasiija de fermentación para la producción de un producto lácteo fermentado. Dichos cultivos se citan generalmente como "cultivos iniciadores" o "iniciadores".

Las cepas de cultivo iniciador comúnmente usadas de bacterias del ácido láctico se dividen generalmente en organismos mesófilos que tienen temperaturas óptimas de crecimiento a aproximadamente 30°C y organismos termófilos, que tienen temperaturas óptimas de crecimiento en el

intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C. Los organismos típicos que pertenecen al grupo mesófilo incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*,
5 *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Las especies bacterianas del ácido láctico termófilas incluyen, a modo
10 de ejemplo, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

Asimismo, las bacterias anaerobias que pertenecen al
15 género *Bifidobacterium*, incluyendo *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium longum* se usan normalmente como cultivos lácteos iniciadores y se incluyen generalmente en el grupo de las bacterias del ácido láctico. Además, se usan especies de *Propionibacterias* como cultivos
20 lácteos iniciadores, en particular, en la fabricación de queso. Además, normalmente se usan organismos que pertenecen al género *Brevibacterium* como cultivos iniciadores para alimentos.

Otro grupo de cultivos iniciadores microbianos son
25 cultivos fúngicos, incluyendo cultivos de levaduras y cultivos de hongos filamentosos, que se usan particularmente en la fabricación de determinados tipos de queso y bebidas. Los ejemplos de hongos incluyen *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum*, *Geotrichum*
30 *candidum*, *Torula kefir*, *Saccharomyces kefir* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización de la presente invención, el microorganismo usado para la fermentación del sustrato a base de leche es *Lactobacillus casei* o una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*
5 *subsp. bulgaricus*.

Los procesos de fermentación para su uso en un método de la presente invención son de sobra conocidos y el experto en la materia sabrá cómo seleccionar condiciones de proceso adecuadas, tales como temperatura, oxígeno,
10 cantidad y características de los microorganismos, aditivos tales como, por ejemplo, carbohidratos, aromas, minerales, enzimas y el tiempo de procesado. Obviamente, las condiciones de fermentación se seleccionan para que soporten la consecución de la presente invención.

15 Como resultado de la fermentación, se reducirá el pH del sustrato a base de leche. El pH de un producto lácteo fermentado de la invención puede encontrarse, por ejemplo, en el intervalo de 3.5-6, tal como en el intervalo de 3.5-5, preferentemente en el intervalo de 3.8-4.8.

20 En un aspecto, se proporciona un método para usar los polipéptidos o la composición de polipéptido o usando uno cualquiera o más de los tipos celulares para producir oligosacáridos. Los oligosacáridos comprenden, pero sin limitación, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos,
25 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 de disacárido tal
30 como, por ejemplo, lactulosa, trehalosa, rhamnosa, maltosa, sacarosa, lactosa o celobiosa. La incubación se lleva a

cabo en condiciones donde se producen los oligosacáridos. Las células pueden ser parte de un producto seleccionado entre el grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, suplementos dietéticos y productos
5 probióticos comestibles. Como alternativa, 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 divulgada en el presente documento para producir un
10 producto seleccionado entre el grupo que consiste en yogur, queso, producto lácteo fermentado, suplemento dietético y producto probiótico comestible.

En un aspecto, los polipéptidos o las composiciones de polipéptido descritos en el presente documento pueden
15 usarse para preparar productos de queso y en métodos para producir los productos de queso. Los productos de queso pueden seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que consiste en queso crema, queso cottage y queso procesado. Al añadir polipéptidos o la composición de polipéptidos, el
20 queso puede contener niveles significativamente aumentados de galactooligosacáridos y niveles reducidos de lactosa. En un aspecto, los niveles de lactosa en el producto de queso final pueden estar reducidos en al menos aproximadamente un
25 por ciento, preferentemente al menos aproximadamente un
25 50 por ciento y más preferentemente en al menos aproximadamente un 75 por ciento. Los polipéptidos o la composición de polipéptido puede usarse para reducir la lactosa en los productos de queso a menos de
30 aproximadamente 1 gramo por ración, una cantidad que puede tolerarse por la mayoría de los individuos intolerantes a la lactosa.

Los productos de queso proporcionados en el presente documento son productos de queso mejorados nutricionalmente que tienen un contenido en fibra soluble aumentado, un contenido calórico reducido, propiedades organolépticas
5 excelentes, textura mejorada y aroma. Además, los polipéptidos descritos en el presente documento 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. Finalmente, los
10 polipéptidos o la composición de polipéptido pueden reducir el coste de producción de los productos de queso, en particular de los productos de queso crema, debido a que los GOS proporcionan sorprendentemente una textura mejorada al producto de queso crema, permitiendo de este modo un uso
15 reducido de estabilizantes o permitiendo un mayor contenido de humedad sin sinéresis.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende un polipéptido o una composición de polipéptido como se describe en el presente documento y
20 un sustrato de carbohidrato. En un aspecto adicional, el sustrato de carbohidrato es un disacárido. En un aspecto adicional, el disacárido es, por ejemplo, lactulosa, trehalosa, rhamnosa, maltosa, sacarosa, lactosa o celobiosa. En un aspecto adicional más, el sustrato de carbohidrato es
25 lactosa. La composición se prepara de tal forma que se producen oligosacáridos. El polipéptido como se describe en el presente documento puede ser parte de un producto seleccionado entre el grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, suplementos dietéticos y
30 productos probióticos comestibles. En un aspecto, se proporciona una composición que comprende un polipéptido

como se describe en el presente documento y un estabilizante. Los ejemplos de estabilizantes son, por ejemplo, un poliol, tal como, por ejemplo, glicerol o propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido
5 láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico (por ejemplo, un éster aromático de borato).

En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido o una composición de polipéptido transgalactosilante como se divulga en el presente documento o de una célula como se describe en el presente documento, para producir
10 galactooligosacáridos. En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido o una composición de polipéptido transgalactosilante como se divulga en el presente documento o de una célula como se divulga en el presente documento para producir galactooligosacáridos para que sea
15 parte de un producto seleccionado del grupo que consiste en yogur, queso, productos lácteos fermentados, suplementos dietéticos 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
20 polipéptido o una composición de polipéptido transgalactosilante como se divulga en el presente documento o de una célula como se describe en el presente documento, para producir galactooligosacáridos para mejorar el crecimiento de *Bifidobacterium*. En un aspecto, se proporciona el uso de un polipéptido o una composición de
25 polipéptido transgalactosilante como se divulga en el presente documento o de una célula como se describe en el presente documento, para producir galactooligosacáridos para mejorar el crecimiento de *Bifidobacterium* en una
30 fermentación de cultivo mixto.

En un aspecto, se proporciona un proceso para producir un polipéptido o una composición de polipéptido transgalactosilante como se divulga en el presente documento que comprende cultivar una célula como se divulga en el presente documento 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 proceso para producir galactooligosacáridos, que comprende la puesta en contacto de un polipéptido o de una composición de polipéptido como se divulga en el presente documento o una célula como se divulga en el presente documento con una solución a base de leche que comprende lactosa.

La adición de oligosacáridos puede potenciar el crecimiento de solo *Bifidobacterium* o de *Bifidobacterium* en un cultivo mixto.

El tratamiento de productos lácteos con enzimas que convierten la lactosa en monosacáridos o GOS tiene varias ventajas. En primer lugar, los productos pueden consumirse 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 mayor dulzor que los productos similares no tratados debido al mayor dulzor percibido de la glucosa y la galactosa en comparación con la lactosa. Este efecto es particularmente interesante para aplicaciones tales como el yogur y el helado donde se desea un elevado dulzor del producto final y esto permite una reducción neta de los carbohidratos en el producto consumido. En tercer lugar, en la producción de helado con frecuencia se observa un fenómeno denominado arenosidad, donde las moléculas de

lactosa se cristalizan debido a la relativa baja solubilidad de la lactosa. Cuando la lactosa se convierte en monosacáridos o GOS, la sensación en boca del helado se mejora en gran medida frente a los productos no tratados.

5 La presencia de una sensación arenosa debido a la cristalización de la lactosa puede eliminarse y pueden reducirse los costes de materias primas mediante el reemplazo de la leche en polvo desnatada por polvo de suero de leche. Los principales efectos del tratamiento
10 enzimático fueron un dulzor aumentado.

En un aspecto, el polipéptido o la composición de polipéptido transgalactosilante como se divulga en el presente documento puede usarse junto con otras enzimas, tales como proteasas, tales como quimosina o renina,
15 lipasas, tales como fosfolipasas, amilasas, transferasas y lactasas. En un aspecto, los polipéptidos transgalactosilantes como se divulgan en el presente documento pueden usarse conjuntamente con lactasa. Esto puede ser especialmente útil cuando existe el deseo de
20 reducir la lactosa residual después del tratamiento con los polipéptidos transgalactosilantes como se divulgan en el presente documento, especialmente a bajos niveles de lactosa.

En una realización, la enzima es una lactasa de una
25 bacteria, por ejemplo, de la familia Bifidobacteriaceae, tal como del género Bifidobacterium, tal como la lactasa descrita en, entre otros, los documentos WO 2009/071539 y WO 2013/182686.

**Ejemplo 1 - Construcción de una célula hospedadora de
30 acuerdo con la invención**

La célula hospedadora de este ejemplo procede de *B. subtilis*.

Eliminación del gen *amyE* de alfa-amilasa: Se introdujo una eliminación creada *in vitro* del gen de tipo silvestre (*amyE*) en una cepa de *B. subtilis* mediante técnicas de ADN recombinante. La eliminación de *amyE* se controló por medio de la actividad así como transferencias de Southern. No permaneció ADN heterólogo en la cepa hospedadora.

Reemplazo del gen *bglC* de endoglucanasa mediante un marcador de espectinomicina: Para eliminar el gen *bglC* se empleó una estrategia que empleaba un método de cre-lox. Se clonaron las secuencias cadena arriba y cadena abajo de *bglC* y la parte intermedia (que se iba a eliminar) se reemplazó por un casete de *loxP*-espectinomicina permitiendo la selección durante la transformación. Se transformó una cepa de *B. subtilis* con la construcción que selecciona respecto de espectinomicina, reemplazando el gen *bglC* genómico por la variante clonada. El ADN genómico de la cepa que contenía el marcador de espectinomicina se integró en una eliminación del locus de la endoglucanasa *bglC* que se usó para transformar la cepa mediante competencia natural. Los clones positivos se determinaron mediante resistencia a la espectinomicina. El gen de resistencia a la espectinomicina está flanqueado por secuencias de *loxP* que posibilitan la eliminación del gen.

Reemplazo del gen *gmuG* de mananasa mediante un marcador de tetraciclina: La mananasa *gmuG* se eliminó usando la misma técnica que para el gen *bglC*, aunque en esta ocasión se usó un marcador de tetraciclina en lugar de un marcador de espectinomicina. Los transformantes se

seleccionaron en medio que contenía tetraciclina y los clones positivos se verificaron mediante PCR.

Reemplazo del gen *pel* de pectato liasa mediante un marcador de espectinomicina: El gen de pectato liasa *pel* se eliminó usando la misma técnica que la empleada para el gen *bglC* reemplazando la ORF de *pel* con el marcador de espectinomicina. Los transformantes se seleccionaron en placas de espectinomicina y se exploraron mediante cPCR.

Introducción del gen BIF917: Se transformó la secuencia codificante para β -galactosidasa divulgada en el documento WO 2013/182626 como "BIF917" en una *B. subtilis* usando métodos expuestos en esta publicación. En términos generales, este describe la producción de polipéptido usando genes sintéticos diseñados para codificar el gen de longitud completa (1752 restos) de *Bifidobacterium bifidum* con codones optimizados para la expresión en *Bacillus subtilis* que se adquirieron en GeneART (Regensburg, Alemania), SEQ ID NO: 8.

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

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

Las SEQ ID para los mutantes de truncamiento y los cebadores inversos correspondientes se indican en la tabla 2 a continuación.

Mutante de truncamiento	Secuencia de cebador
BIF917 (SEQ ID NO: 8)	GCGCTTAATTAATTATGTTTTTCTGTGCTTGTTTC

5	9)	SEQ ID NO: 16
	BIF995 (SEQ ID NO: 10)	GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTTTCATCAATCA SEQ ID NO: 17
	BIF1068 (SEQ ID NO: 11)	GCGCTTAATTAATTATTGAACTCTAATTGTCGCTG SEQ ID NO: 18
	BIF1172 (SEQ ID NO: 12)	
	BIF1241 (SEQ ID NO: 13)	GCGCTTAATTAATTATGTCGCTGTTTTTCAGTTCAAT SEQ ID NO: 19
10	BIF1326 (SEQ ID NO: 14)	GCGCTTAATTAATTAAAATTCTTGTTCTGTGCCCA SEQ ID NO: 20
	BIF 1478	GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTTGCTTGCGC SEQ ID NO: 21

Tabla 2

15 El gen sintético se clonó en el vector de expresión en *Bacillus subtilis* pBNspe usando los sitios de restricción únicos SpeI y PacI y los plásmidos aislados se transformaron en una cepa de *Bacillus subtilis*. Los transformantes se volvieron a sembrar en placas LB que
20 contenían 10 µg/ml de neomicina como selección.

Medición de la actividad de β-galactosidasa

La actividad enzimática se midió usando el sustrato comercialmente disponible 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) (Sigma N1127).

25 ONPG sin aceptor
KPO4 100 mM, pH 6.0
ONPG 12,3 mM
ONPG complementado con aceptor
KPO4 100 mM, pH 6.0
30 Celobiosa 20 mM
ONPG 12,3 mM

Solución de PARO

Na₂CO₃ al 10%

Se añadieron 10 µl de diluciones en serie de enzima purificada en los pocillos de una placa de microtitulación que contenía 90 µl de ONPG-tampón con o sin aceptor. Las muestras se mezclaron e incubaron durante 10 min a 37°C, posteriormente, se añadieron 100 µl de solución de PARO a cada pocillo para terminar la reacción. Las mediciones de absorbancia se registraron a 420 nm en un lector de placas SpectraMax de Molecular Devices controlado por el paquete informático Softmax.

La relación de transgalactosilación se calculó del modo siguiente:

Relación de actividad de transgalactosilación = $(\text{Abs}_{420}^{+\text{Celobiosa}} / \text{Abs}_{420}^{-\text{Celobiosa}}) * 100$, para diluciones donde la absorbancia era entre 0.5 y 1.0.

Determinación de la actividad de LAU

Principio:

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

Reactivos:

Tampón MES, pH 6.4 (MES 100 mM, pH 6.4, CaCl₂ 10 mM): Se disuelven 19,52g de hidrato de MES (Pm: 195.2 g/mol, Sigma-aldrich n.º M8250-250G) y 1.470g de dihidrato de CaCl₂ (Pm: 147.01g/mol, Sigma-aldrich) en 1000 ml de H₂Odd, se ajusta el pH a 6.4 mediante NaOH 10M. Se filtra la

solución a través de un filtro de 0.2µm y se almacena a 4°C durante hasta 1 mes.

5 Sustrato de ONPG, pH 6.4 (ONPG 12.28mM, MES 100mM, pH 6.4, CaCl₂ 10mM): Se disuelven 0.370g de 2-o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG, Pm: 301.55 g/mol, Sigma-aldrich n.º N1127) en 100 ml de tampón MES, pH 6.4 y se almacena en la oscuridad a 4°C durante hasta 7 días.

10 Reactivo de paro (Na₂CO₃ al 10%): Se disuelven 20.0g de Na₂CO₃ en 200ml de H₂O, se filtra la solución a través de un filtro de 0.2µm y se almacena a TA durante hasta 1 mes.

Procedimiento:

15 La dilución en serie de la muestra enzimática se efectuó en el tampón de 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 de ONPG a pH 6.4. Las muestras se mezclaron e incubaron durante 5 min a 37°C usando un Thermomixer (Comfort Thermomixer, Eppendorf) y posteriormente se
20 añadieron 100 µl de reactivo de paro a cada pocillo para terminar la reacción. Se construyó un blanco usando tampón MES a pH 6.4, en lugar de la muestra enzimática. El aumento de la absorbancia a 420 nm se midió en un lector de ELISA (lector de placas SpectraMax, Molecular Devices) frente al
25 blanco.

Cálculo de la actividad enzimática:

30 Se determinó el coeficiente de extinción molar del 2-o-nitrofenol (Sigma-aldrich, n.º 33444-25G) en tampón de MES a pH 6.4 ($0.5998 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). 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 la luz de 0.52cm) puede calcularse la actividad de lactasa por ml de la muestra de enzima usando la siguiente ecuación:

5
$$LAU/ml \left(\frac{nmol}{min \cdot mL} \right) = \frac{Abs_{420} \times 200\mu L \times \text{factor de dilución}}{0.5998 \cdot 10^3 \cdot nM^{-1} \cdot cm^{-1} \times 0.52cm \times 5min \times 0.01mL}$$

Cálculo de la actividad específica para BIF917
mostrado en el presente documento como la SEQ ID NO: 1:

Determinación de la concentración de BIF917:

10 La cuantificación de la enzima diana (BIF917) y de los productos de truncamiento se determinaron usando el sistema de SDS-page libre de Criterion Stain (BioRad). Se usó gel precolado sin colorante para cualquier kD con Tris-HCl al 4-20%, 18 pocillos (Comb n.º 345-0418) con un tampón de
15 Serva Tris - Glicina/SDS (BioRad n.º de cat. 42529). Los geles se corrieron con los siguientes parámetros: 200 V, 120 mA, 25 W, 50 min. Se usó BSA (1,43 mg/ml) (Sigma-Aldrich, n.º de cat. 500-0007) como patrón de proteína y se usó un Criterion Stain Free Imager (BioRad) con el programa
20 informático Image Lab (BioRad) para la cuantificación usando la intensidad de las bandas con correlación del contenido de triptófano.

Se determinó la actividad específica de LAU de BIF917 a partir de fermento en bruto (concentrado de
25 ultrafiltración) de dos fermentaciones independientes (como se describe en el método 1) y usando 5 diluciones diferentes (véase la tabla 1).

Se observó que la actividad específica de BIF917 era de 21.3 LAU/mg o de 0.0213 LAU/ppm.

30 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
5								
1	BIF 917	a	5	26.9	1.23	1232	21.9	0.0219
10								
2	BIF 917	a	10	53.9	2.44	2437	22.1	0.0221
3	BIF 917	a	10	75.4	3.56	3556	21.2	0.0212
4	BIF 917	a	20	163.9	7.78	7778	21.1	0.0211
15								
5	BIF 917	a	30	233.6	11.06	11065	21.1	0.0211
6	BIF 917	b	5	30.26	1.34	1342	22.6	0.0226
20								
7	BIF 917	b	10	55.91	2.61	2607	21.4	0.0214
8	BIF 917	b	10	76.96	3.70	3697	20.8	0.0208
9	BIF 917	b	20	156.9	7.75	7755	20.2	0.0202
25								
10	BIF 917	b	30	236.9	11.45	11452	20.7	0.0207
						Arg	21.3	0.0213
30						Est	0.700976	0.000701

Ejemplo 2**Prueba: 1****Ensayo: Actividad de P-mananasa, azúcar reductor (MU)**

5 Este método de ensayo debe usarse para determinar la actividad de mananasa en unidades MU (Unidades de Mananasa).

PROPÓSITO Este ensayo es adecuado para el control de QA/QC de la actividad de mananasa.

10 **PRINCIPIO** Este ensayo mide la liberación de los azúcares reductores mediante la acción de Endo-1,4-P-D-mananasa en un sustrato de goma de algarrobo (LBG). Se usa la reacción del ácido dinitrosalicílico para determinar el aumento en el contenido de azúcar reductor, que es proporcional a la actividad enzimática añadida.

PROCEDIMIENTO**1. Materiales y equipamiento****1.1 Centrifugadora, capacidad hasta 3500 rpm**

20 **1.2 Baño de agua ajustado a 40⁰ C**

1.3 Baño de agua ajustado a 60⁰ C**1.4 Baño de agua en ebullición****1.5 Pipetas y puntas de desplazamiento positivo (Ranin Inc.)**

25 **1.6 Vortex**

1.7 Tubos de ensayo de vidrio de 16 x 100mm (con tapas)**1.8 Cronómetro**

30 **1.9 Matraces volumétricos, cilindros graduados, vasos de precipitados**

1.10 Barras de agitación magnética y placa de agitación/caliente

- 1.11 Embudo de filtro de vidrio sinterizado
- 1.12 Medidor de pH
- 1.13 Balanza analítica
- 1.14 Balanza preparativa
- 5 1.15 Termómetros
- 1.16 Baño de agua helada
- 1.17 Espectrofotómetro, con capacidad de lectura a 540 nm
- 1.18 Dispositivo de pipeteado variable (1 ml) con
10 puntas desechables
- 1.20 Horno o autoclave para el material de vidrio
- 2. Reactivos: Se usan los siguientes reactivos o equivalentes
- 2.1 Hidróxido de amonio, concentrado (28-30%)
- 15 2.2 Clorhidrato de tris-hidroximetilaminometano (Tris)
- 2.3 Gránulos de hidróxido de sodio
- 2.4 Ácido 3,5-dinitrosalicílico, 98%, (DNS), Sigma-Aldrich n.º de cat. 128848
- 20 2.5 Goma de algarrobo, Sigma Chemical n.º G0753
- 2.6 Tartrato de sodio y potasio, tetrahidrato, Sigma-Aldrich n.º de cat. 217255
- 2.7 Agua desionizada
- 2.8 1-Propanol
- 25 3. Preparación de los reactivos
- 3.1 Hidróxido de amonio al 1.5%
- 3.1.1 Usando agua desionizada, se diluyen 5ml de hidróxido de amonio al 30% hasta 100ml en un matraz volumétrico.
- 30 3.2 Tampón de Tris-clorhidrato
- 3.2.1 Se disuelven 15.67g de Tris-clorhidrato en

aproximadamente 1900ml de agua desionizada. Se ajusta a pH 7.5 $\pm$ 0.05 con hidróxido de amonio (1.5%) y se diluye hasta 2000ml con agua desionizada. Esta solución puede conservarse durante al menos dos semanas a temperatura ambiente.

3.3 Hidróxido de sodio al 10.67%

3.3.1 Se añaden 32.0g de gránulos de hidróxido de sodio a 200ml de agua desionizada. Se agita hasta su disolución y se enfría. Se enrasa hasta 300 ml con agua desionizada.

3.4 Reactivo DNS

(a) Se suspenden 20g de DNS en 1000ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 2 l. Se añaden 300ml de solución de hidróxido de sodio al 10.67%.

(b) Se calienta la suspensión en una placa de agitación calentada hasta que la solución se vuelve transparente. La temperatura no debe superar los 50°C.

(c) Se añaden gradualmente 600g de tetrahidrato de tartrato de sodio y potasio a la solución con mezclado continuo. Se permite que la solución alcance la temperatura ambiente.

(d) La solución se diluye hasta 2000ml con agua desionizada y se filtra en caso necesario a través de un filtro grueso de vidrio sinterizado. Se almacena en una botella de color ámbar oscuro a temperatura ambiente. La solución permanece en buen estado durante al menos dos meses.

3.5 Solución de sustrato de goma de algarrobo (LBG)

3.5.1 Hay que asegurarse de que todo el material de vidrio que entra en contacto con el sustrato está extremadamente limpio y libre de posible contaminación por

mananasa. Se recomiendan lavados con 1-propanol o cocción a 120°C.

5 **5.1.1** Se colocan 500ml de tampón de Tris-clorhidrato en un vaso de precipitados de 1000ml. Se coloca el vaso de precipitados en un baño de agua en ebullición o en una placa de agitación calentada y se permite que la temperatura en el vaso de precipitados alcance los 80°C. Se agita rápidamente la solución mientras que a la vez se añaden muy lentamente 1.4 g de goma de algarrobo. Se reduce el mezclado y se mantiene la solución a 60°C en un baño de agua durante 60 minutos. Se enfría hasta temperatura ambiente. Se ajusta a 500 ml con agua desionizada. Se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos. Se usa el sobrenadante transparente como sustrato.

15 **3.6 Preparación del patrón de enzima**

3.6.1 Se selecciona un lote de producto final de mananasa como patrón. Esto se ajusta igual al valor de MU comunicado en el certificado de análisis del lote. Usando este material, se prepara una curva patrón de 3 puntos usando una muestra de concentración conocida en MU/litros. Se diluye el patrón del mismo modo, usando tampón de Tris-clorhidrato de tal forma que su absorbancia neta cae por debajo del intervalo lineal del ensayo después de restar el blanco de reactivo. El intervalo lineal de este ensayo es de 0.17 y 0.52 AA. La curva patrón y las concentraciones de la muestra entre 0.050 - 0.140 MU/litro se encuentran típicamente dentro del intervalo lineal de este ensayo.

3.7 Preparación de la muestra líquida

30 **3.7.1** Se diluye cada muestra (p/v) en tampón de Tris-clorhidrato, de tal forma que la reacción del ensayo indicada en la sección 4 se encuentra entre 0.17 y 0.52 AA

a 540nm.

3.7.2 Las soluciones enzimáticas diluidas se almacenan sobre hielo. Para obtener los mejores resultados, las soluciones de enzima diluidas deben ensayarse antes de
5 1 hora.

4. Procedimiento de ensayo

4.1 Muestras enzimáticas - Las muestras enzimáticas deben ensayarse por duplicado

4.1.1 Se equilibran 2ml de sustrato LBG a 40°C en
10 tubos de ensayo de vidrio de 16x100 durante 20 minutos.

4.1.2 Se añaden 0.5ml de dilución de muestra enzimática, se mezcla y se incuban durante exactamente 10 minutos.

4.1.3 Se detiene la reacción mediante la adición
15 de 3.0 ml de la solución de DNS y se mezcla.

4.1.4 Se hierve la muestra durante 15 minutos en el baño de agua en ebullición, cubriendo la parte superior de cada tubo de ensayo con una tapa para impedir la evaporación. Se enfría en un baño de agua helada durante 50
20 minutos. Se permite que las muestras se equilibren a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5.1.1 Se lee la absorbancia a 540 nm contra el blanco de agua desionizada. La absorbancia debe estar entre 0.17 y 0.52 AA, después de restar el blanco de reactivo.

25 4.2 Blanco de reactivo

4.2.1 El blanco puede ejecutarse individualmente. Este control de reacción es para reducir el azúcar presente en el sustrato LBG o presente en la muestra enzimática.

5.1.1 Se equilibran 2ml de sustrato LBG a 40°C en
30 tubos de ensayo de vidrio de 16x100 durante 20 minutos.

5.1.2 Se incuba durante 10 minutos adicionales.

5.1.3 Se añaden 3.0ml de solución de DNS y se mezcla. Se añaden 0.5ml de dilución de enzima y se mezcla de nuevo.

5.1.4 Se hierve durante 15 minutos en el baño de agua en ebullición, cubriendo la parte superior del tubo de ensayo con una tapa para impedir la evaporación. Se enfría en un baño de agua helada durante 5 minutos. Se permite que las muestras se equilibren a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5.1.5 Se lee la absorbancia a 540 nm contra el blanco de agua desionizada.

5. Cálculos

5.1 Para determinar la absorbancia neta, se resta la media del blanco de reactivo/enzima de la lectura de absorbancia de todos los patrones y muestras.

5.2 Se prepara una curva patrón usando regresión lineal, donde la absorbancia neta se encuentra en el eje Y y la concentración (MU/litros) en el eje X.

5.3 El coeficiente de relación debe ser >0.998.

5.4 Se determina la concentración de cada muestra mediante regresión lineal.

5.5 Para líquidos: **MU Mananasa /kg muestra = valor de la curva (MU/litro) * factor de dilución de muestra (volumen total (litro)/peso de la muestra(kg))**

Ejemplo 3

Prueba 2: Actividad de endoglucanasa, Actividad de carboximetilcelulosa (CMC)

PROPÓSITO Este método de ensayo debe usarse para determinar la actividad de endoglucanasa de celulasa en unidades CMC.

Nota: La celulasa comunicada en UI/g o UI/ml (unidades

internacionales) es equivalente a CMC/g o CMC/ml, respectivamente.

PRINCIPIO Este ensayo mide la liberación de azúcares reductores mediante la acción de celulasa en un sustrato de CMC. La velocidad de liberación de azúcar reductor, medida mediante la reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es proporcional a la actividad enzimática. Una unidad de CMC se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 μ mol de equivalentes de azúcar reductor de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo. La actividad en este procedimiento se mide en relación con un patrón de enzima con unidades CMC asignadas.

PROCEDIMIENTO

1.0 Materiales y equipamiento

1.18 Tubos de ensayo de 18 x 150 mm

1.19 Bolas

1.20 Cubetas

1.21 Pipetas y puntas de desplazamiento positivo, Ranin Inc.

1.22 Medidor de pH

1.23 Baño de agua ajustado a 50⁰ C

1.24 Baño de hielo

1.25 Baño de agua en ebullición

1.26 Espectrofotómetro

1.27 Agitador magnético

1.28 Cronómetro

1.29 Filtro de vidrio grueso, VWR KT93700-47

1.30 Botella ámbar oscuro

1.31 Pipetas de desplazamiento positivo

1.32 Vortex

1.33 Gradilla para tubos de ensayo

2.0 Reactivos: Se usan los siguientes reactivos o equivalentes.

2.9 Sal de sodio de carboximetilcelulosa sódica

Fluka 21900, el grado de sustitución debe ser de
5 0.70-0.85

2.10 Ácido 3,5-dinitrosalicílico, sal de sodio (DNS),
Merck 10846

2.11 Tartrato de sodio y potasio, tetrahidrato, Merck
8087

10 **2.12** Hidróxido de sodio, grado de reactivo

2.13 Ácido acético glacial, grado de reactivo

3.0 Preparación de reactivos

3.1 Tampón de acetato de sodio 0.05 M, pH 4.8

3.1.1 A 900 ml de agua destilada se le añaden 2.85
15 ml de ácido acético glacial. Mientras que se agita con una
barra de agitación magnética, se ajusta el pH a 4.8 con
hidróxido de sodio al 50%. Se enrasa hasta un volumen total
de un litro con agua destilada.

3.4 Solución de hidróxido de sodio al 10.67% (p/v)

20 **3.2.1** Se añaden 32.0 g de gránulos de hidróxido de
sodio a 200 ml de agua destilada. Se agita hasta su
disolución y se enfría. Se enrasa hasta 300 ml con agua
destilada.

3.5 Solución de sustrato de CMC al 1%

25 **3.3.1** A 99 ml de tampón de acetato de sodio, se le
añade 1.00 g de CMC. Se agita para mezclar exhaustivamente
y se mantiene a 4°C durante al menos 1 hora antes de su
uso. La solución es estable durante 3 días a 4°C.

3.6 Ácido 3,-5-dinitrosalicílico (DNS) al 1%

30 (e) Se suspenden 20.0 g de DNS en 1000 ml de agua
destilada y se añaden gradualmente 300 ml de la solución de

hidróxido de sodio al 10.67% mientras se mezcla.

(f) Se calienta la suspensión en un baño de agua ajustado a 50°C (122° F) hasta que la solución se vuelve transparente. La temperatura del baño de agua no debe
5 superar los 50°C.

3.4.3 Se añaden gradualmente 600 g de tetrahidrato de tartrato de sodio y potasio a la solución con mezclado continuo.

3.4.4 Se diluye la solución hasta 2000 ml con agua
10 destilada y se filtra a través de un filtro de vidrio grueso. Se almacena en una botella de color ámbar oscuro a temperatura ambiente. La solución es estable durante 2 meses. La solución debe permanecer transparente para su uso.

15 **4.1 Preparación de la muestra en gránulos**

3.7.2 Se disuelven muestras en gránulos en tampón acetato, de tal forma que la absorbancia neta obtenida de la reacción de ensayo indicada en la sección 4.5 se encuentra entre 0.4 y 0.5. Una preparación a
20 aproximadamente 0.2 CMC/ml producirá típicamente la absorbancia deseada.

3.7.3 Cuando se preparan muestras, se pesan al menos 100 mg de gránulos. Se disuelven del mismo modo con tampón acetato según el apartado 4.1.1 usando agitación
25 magnética. Se registra la concentración de gránulo en mg/ml para los cálculos de 5.1. Se mezcla a velocidad media durante al menos 20 minutos. Se almacenan las muestras diluidas sobre hielo. Es estable durante al menos 2 horas.

3.7.4 Obsérvese que algunas muestras formarán una
30 fina suspensión después del tiempo de mezclado. Deben tomarse muestras de suspensión representativas para llevar

a cabo el ensayo en 4.5.

4.1.4 Se efectúa cada preparación de muestra granular por triplicado.

4.2 Preparación de la muestra líquida

5 **4.1.3** Se diluye cada muestra en tampón acetato, de tal forma que la absorbancia neta obtenida de la reacción de ensayo indicada en la sección 4.5 se encuentra entre 0.4 y 0.5. Una preparación a aproximadamente 0.2 CMC/ml producirá típicamente la absorbancia deseada.

10 **4.1.4** Cuando se preparan muestras, se separan alícuotas de al menos 0.10 ml de muestra líquida usando una pipeta de desplazamiento positivo. Se almacena la muestra diluida sobre hielo.

Es estable durante al menos 2 horas.

15 **4.1.5** Se efectúa cada preparación de muestra líquida por triplicado.

4.3 Preparación del patrón de trabajo

4.4

20 **4.3.1** Se selecciona un lote de producto final de celulasa (ya sea líquida o en gránulo) como patrón. Esto se ajusta igual al valor de CMC comunicado en el certificado de análisis del lote. Usando este material, se prepara un patrón de trabajo de CMC/ml conocido según los epígrafes 4.1 o 4.2. Se diluye el patrón usando tampón acetato, de tal forma que la absorbancia neta obtenida de la reacción de ensayo indicada en la sección 4.5 se encuentra entre 0.4 y 0.5. Una preparación de una solución patrón a aproximadamente 0.2 CMC/ml producirá típicamente la absorbancia deseada.

30

4.3.2 Se registra la actividad del patrón de trabajo

en CMC/ml. Se usa esto en las secciones de cálculo 5.1 y 5.2.

4.3.3 Se prepara el patrón por triplicado.

4.4 Solución de blanco

5 **4.4.1** Se usa tampón acetato como blanco de solución enzimática en la sección 4.5. Se ejecuta cada blanco de solución enzimática por duplicado.

4.5 Reacción de ensayo enzimático

4.5.1 Se incuba 1.00 ml de sustrato CMC a 50°C en
10 tubos de ensayo de 18 x 150 mm durante 10-15 minutos, dispuestos en una gradilla para tubos de ensayo.

4.5.2 A intervalos de 20 segundos, se añade 1.00 ml de las diluciones enzimáticas y los blancos para el sustrato CMC usando una pipeta de desplazamiento positivo.
15 Se mezcla y se incuba cada reacción a 50°C (122°F) durante 10 minutos.

4.5.3 A los mismos intervalos que en el apartado 4.5.2, se añaden 3.0 ml de solución DNS y se mezcla.

4.5.4 Se hierven todas las mezclas de reacción +
20 DNS durante exactamente 5 minutos colocando los tubos de ensayo y la gradilla en un baño de agua en ebullición. Se cubren las partes superiores de los tubos de ensayo con bolas para impedir la evaporación durante la ebullición. Todas las muestras, patrones y blancos deben hervirse
25 juntos. Después de la ebullición, se enfrían los tubos de ensayo en un baño de hielo.

4.5.5 Se mide la absorbancia de las muestras de enzima y los blancos a 540 nm frente a agua destilada como absorbancia cero.

30 **4.5.6** Se resta la media del blanco de absorbancia de la absorbancia media de las muestras y de los patrones.

Esta absorbancia neta debe ser de entre 0.4-0.5. En caso de que no lo sea, debería repetirse el ensayo.

4.5.7 Se ejecuta cada muestra de enzima por triplicado en el ensayo.

5 **5.0 Cálculos**

5.1 Se calcula la actividad en las muestras granulares del modo siguiente:

CMC/g (o UI/g) = **(abs. neta de la muestra) (CMC/ml de patrón de trabajo) (1000 mg/g)** (abs. neta del patrón de trabajo) (mg de gránulo/ml de tampón acetato)

5.2 Se calcula la actividad en las muestras líquidas del modo siguiente:

CMC/ml (o UI/ml) = **(abs. neta de la muestra) (CMC/ml de patrón de trabajo) (dilución de la muestra)**
(abs. neta del patrón de trabajo)

Nota: La celulasa comunicada en UI/g o UI/ml (unidades internacionales) es equivalente a CMC/g o CMC/ml, respectivamente.

Ejemplo 4

20 ***Prueba 3***

Se usa un método de viscosidad basado en Viscoman. Este método puede usarse en la presente para la detección de niveles muy bajos de actividades de mananasa, amilasa, CMCase y pectinasa. (También se divulgan métodos de viscosidad útiles en el documento US 2013/0045498 que se incorpora por referencia). El hidrocoloide se escinde por la enzima, creando de este modo una caída en la viscosidad de la solución de hidrocoloide. La reducción de viscosidad se presenta como un valor de viscosidad relativo calculado a partir de la viscosidad de una muestra de hidrocoloide con enzima añadida en relación con una muestra de

hidrocoloide a la que se añade H₂O. Por lo tanto, el valor será siempre de entre 1 y 0, donde 1 significa ausencia de reducción en la viscosidad de la muestra.

Los sustratos son GUAR, almidón, CMC o pectina.

5 Se usan dos tampones dependiendo del sustrato;

Ácido cítrico-fosfato de McIlvaine:

A) Ácido cítrico 0.1M; 21.0 g de C₆H₈O₇, H₂O / 1L de agua desmineralizada

B) hidrogenofosfato disódico 0.2M; 35.6 g de Na₂HPO₄, 2H₂O/ 1L de agua desmineralizada. Vida útil: 3
10 meses

Tampón, pH 4.0 = 71.50 ml **A** + 28.50 ml **B** (en un cilindro graduado)

Tampón, pH 6.7 = 25.00 ml **A** + 75.00 ml **B**

15 *Concentraciones de sustrato:*

Pectina	2.0%	pH 4.0
---------	------	--------

CMC	0.5%	pH 6.7
-----	------	--------

GUAR	0.5%	pH 6.7
------	------	--------

Almidón	3.0%	pH 6.7
---------	------	--------

20 *Preparación de solución de sustrato:*

El tampón usado para el sustrato específico se diluye cinco veces con agua y se calienta en botellas Blue Cap sobre una placa caliente con imán. Se pesa el hidrocoloide y cuando burbujea el tampón, se espolvorea el polvo bajo
25 agitación vigorosa hasta que se diluye (apl. 30 min). Para el almidón, se recomienda desconectar el calentamiento durante la adición del sustrato y se retira la tapa de la botella y se evita que hierva el sustrato principalmente para impedir la formación de grumos, etc. La solución de
30 hidrocoloide se enfría a 40°C, salvo para la solución de

almidón. El almidón debe almacenarse a 50°C hasta su uso para evitar la retrogradación.

Tratamiento de la muestra

Se transfieren 5 ml de sustrato para cada muestra, incluyendo blanco, a un vidrio Wheaton. Se añaden 100 µl de muestra de enzima o diluciones (elaboradas con agua) a los 5 ml de solución de sustrato y se mezcla. Pueden añadirse hasta 500 µl de muestra en tanto que se aplique el mismo volumen a la muestra de blanco. Las muestras se incuban a 40°C durante 20 h y después se detiene la reacción poniendo las muestras sobre hielo. Las muestras se templean después a 10°C para medir la viscosidad usando un dispositivo Brookfield.

Ejemplo 5

Exploración de actividad secundaria enzimática

La exploración se llevó a cabo en la muestra 1 y en la lactasa comercial GODO YNL2 por comparación. La muestra 1 es una composición de polipéptido que comprende una enzima que tiene actividad transgalactosilante producida por una célula hospedadora de B. subtilis en la que no están inactivadas la celulasa, la mananasa y la pectinasa. Los ensayos y los resultados se enumeran en la tabla 2. Se observó que la muestra 1 tenía niveles significativamente mayores de actividad de mananasa y CMCasa en comparación con la lactasa GODO YNL2.

Tabla 2

ID de la muestra	Muestra 1	GoDo-YNL2
Prueba 3 Pectinasa, Act.Rel.	Uf: 0,552	Uf: 0,806
	F10: 0,895	F10: 1,016
	F100: 0,964	F100: 0,989

5	Prueba 3 Mananasa, Act.Rel.	Uf: 0,006, F10: 0,009 F100: 0,011	Uf: 1,010 F10: 1,011 F100: 1,001
	Prueba 3 CMCasa, Act.Rel.	Uf: 0,010 F10: 0,008 F100: 0,010	Uf: 0,989 F10: 0,995 F100: 1,021

Semicuantificación de los niveles de mananasa y celulasa

Se evaluó el nivel de la celulasa y la mananasa presente en la muestra 1 diluyendo la muestra hasta que prácticamente no pudo observarse cambio en la viscosidad. Se ensayó una enzima macerante para determinar si tenía un efecto en el nivel de mananasa y celulasa presente en el producto final cuando se usa en el medio de soja durante la fermentación. La enzima macerante es una celulasa conocida y por lo tanto se ensayó únicamente respecto de la actividad de mananasa ya que se esperaría la actividad de celulasa. El grado de las diluciones (véase la tabla 3) indica un alto nivel de actividad de mananasa en la enzima macerante y un alto nivel de actividad tanto de mananasa como de celulasa en la muestra. El nivel de actividad de mananasa presente en la enzima macerante no podía explicar por sí solo el nivel de mananasa presente, ya que la viscosidad relativa era cercana a 1 en una dilución de F10.000 de la enzima macerante, mientras que la muestra 1 tuvo que diluirse hasta más de F100.000 para que se aproximase a 1 en la viscosidad relativa.

Viscosidad relativa de una solución de GUAR o CMC añadida a 100µl de la dilución indicada de solución madre de enzima maceradora o de muestra 1. La solución madre de enzima maceradora es una dilución 54x de la muestra

maceradora que corresponde a la dilución efectuada cuando se añade la enzima al medio de soja durante la fermentación.

Tabla 3

Dilución de la muestra	Solución madre de enzima maceradora, dilución 54 x GUAR	BIF 917 GUAR	BIF 917 CMC
1x	0,034		0,009
10x	0,235	0,044	
100x	0,708	0,054	
1.000x		0,123	
10.000x	0,957	0,429	0,302
100.000x		0,900	0,874

Exploración de actividad secundaria en nueva cepa hospedadora con eliminación génica para pectinasa, mananasa y celulasa

Se decidió eliminar génicamente la pectinasa, la celulasa y la mananasa de la cepa hospedadora de B. subtilis (muestra 2) y después volver a ensayar la presencia de las actividades secundarias. Se recibió para su análisis una muestra de la primera fermentación de 3K usando la nueva cepa. Comparando los resultados con la muestra de 3K con las que usan la muestra 1, fue evidente que los niveles de actividad secundaria para pectinasa, celulasa y mananasa fueron menores usando la muestra 2 (véase la tabla 4).

Tabla 4

	Act. relativa de pectinasa	Act. relativa de mananasa	Act. relativa de CM Casa
5 Muestra 1	Uf: 0,552	Uf: 0,006,	Uf: 0,010
Lactasa	F10: 0,895	F10: 0,009	F10: 0,008
	F100: 0,964	F100: 0,011	F100: 0,010
10 Muestra 2	F1: 0,607	Uf: 0,009	Uf: 0,025
Lactasa	F10: 1,020	F10: 0,223	F10: 0,030
	F100: 1,027	F100: 0,875	F100: 0,081

Especificaciones para los ensayos de viscosidad usando el dispositivo Gilson Viscoman

Para determinar los niveles umbral de actividad de mananasa y celulasa en aplicación de yogur, se usó un ensayo para la cuantificación de la actividad de mananasa y celulasa basado en la reducción de viscosidad. Para este ensayo, se usó un dispositivo Viscoman pipetman de Biolab A/S para determinar la viscosidad en cada muestra.

Para determinar la variación en una muestra usando el dispositivo Viscoman, se midió la viscosidad en sustrato GUAR al 0.5% elaborado acorde con la prueba 3. Se efectuaron tres mediciones de la muestra en 6 preparaciones de sustrato diferentes. La variación máxima observada en 6 ejecuciones fue ~4%. Por seguridad, el límite de variación dentro de una muestra se ajustó al 5%. Para que la variación de la muestra de blanco no se solapase con la variación de una muestra con enzima añadida los presentes inventores necesitaron observar un cambio en la viscosidad de más del 10%. Esto significa que la viscosidad relativa debe ser menor de 0.9 para poder afirmar que la muestra contenía actividad de mananasa. El límite superior en

términos de viscosidad relativa para la curva patrón se ajustó consecuentemente a 0.85.

Tabla 5

N.º de ejecución	Viscosidad media (Cp)	DES. EST.	CV%
1	51,67	0,23	0,45
2	64,57	0,81	1,25
3	68,00	0,82	1,20
4	68,30	2,62	3,84
5	77,10	1,51	1,96
6	78,80	1,40	1,78

Se ensayó el intervalo de dilución de enzima adecuado para un ensayo de viscosidad de mananasa usando un patrón de 699 MU/kg. También se ensayó una muestra que contenía actividad de mananasa, la muestra 1. Se observó mediante el método de mínimos cuadrados que los datos presentaron una línea recta cuando se representó la viscosidad relativa frente a LN (MU/kg) (véase la fig. 2). A partir de 6 ejecuciones con las diluciones de patrón de enzima en sustrato GUAR se llegó a la conclusión de que se obtuvo una línea recta en la que $R^2 \geq 0.98$, dentro del intervalo 0.25-0.85 (datos no mostrados). Para limitar la cantidad de pruebas, se determinó una especificación para los valores de viscosidad relativas para que fuesen ≥ 0.25 y ≤ 0.85 para todos los sustratos usados.

La gráfica en la figura 2 muestra la viscosidad relativa representada frente a LN (MU/kg) para diluciones de la muestra 1, patrón en el que se determinó la viscosidad usando la velocidad 2 en el dispositivo Viscoman. También muestra la viscosidad relativa para muestras de 1-4 MU/kg de la muestra 1 determinadas con la velocidad 1 y

para muestras de 5-80 MU/kg de la muestra 1 determinadas a la velocidad 2, representadas frente a LN (MU/kg).

Además, también fue evidente que la función lineal solo podía obtenerse cuando se tenían datos que usaban la misma velocidad en el dispositivo Viscoman (véase la fig. 1). Los datos se han obtenido a la misma velocidad en el dispositivo Viscoman. Las muestras con baja viscosidad son las más relevantes para este ensayo y por lo tanto, todas las muestras deben medirse usando la velocidad 2, lo que significa que la viscosidad es menor de 400 mPa · s. Por lo tanto, se definió que la muestra de blanco de sustrato debía tener una viscosidad de entre 60-130 mPa · s cuando se mide con el dispositivo Viscoman a la velocidad 2.

Ensayo de mananasa cuantitativo

Para configurar un ensayo cuantitativo de mananasa basado en la viscosidad relativa, los presentes inventores emplearon un control establecido y un patrón de 450 MU/kg procedente de un ensayo colorimétrico de mananasa. Se determinó la actividad de mananasa de la muestra 1, la muestra 2 y la enzima macerante. Extrapolando la recta, se observa que el límite de detección es ~0.003 MU/kg para polvo (máx. 1g en 10 ml) y de 0.0003 MU/kg para líquido.

Cada muestra se trató del modo descrito en la prueba 3, pero la viscosidad se determinó usando el dispositivo Viscoman. Se usó una curva patrón de cuatro puntos para calcular la actividad de mananasa de cada muestra. La siguiente tabla se refiere a la fig. 3.

ID de la muestra	Act. (MU/kg)
Control	671,51
Patrón	742,62

Muestra 1	9,14
Muestra 2	0,062
Enzima macerante	3,089

5

Un cálculo muestra que la actividad de mananasa en la muestra 2 tiene su origen principalmente en la enzima macerante (3 MU/kg dividido entre 54, correspondiente a la dilución cuando se añade la enzima macerante en el medio de soja). Por lo tanto, puede confirmarse que el gen de mananasa se ha eliminado génicamente de manera eficaz de la cepa hospedadora.

Ensayo de celulasa cuantitativo

El control. 2222 CMCU/g y el patrón. 2306 CMCU/g se usaron para configurar un ensayo cuantitativo de celulasa basado en la viscosidad relativa. Los valores de viscosidad relativos para el patrón se representaron frente a LN (CMCU/g) y se confirmó que eran lineales dentro de la viscosidad relativa de 0,242-0,885 (véase la fig. 4). Extrapolando la recta, se observa que el límite de detección para este ensayo es ~ 0.002 CMCU/g para líquidos y de 0.02 CMCU/g para polvos.

Se ensayaron dos muestras adicionales procedentes de las fermentaciones con y una sin enzima maceradora respecto de su actividad de celulasa conjuntamente con las muestras existentes. Los resultados demuestran que la eliminación génica de las celulasas de la cepa hospedadora había sido eficaz (34 CMCU/g frente a ~4 CMCU/g) aunque aún había cierta actividad presente debido a la adición de la enzima maceradora en el medio de soja durante la fermentación (véase la tabla 6 y la figura 4).

Tabla 6

ID de la muestra	CMCU/g
Control	2414
Muestra 1	34,38
Muestra 2	4,1
Patrón: fermentación con enzima maceradora, 806 LAU/g	3,4
Patrón: fermentación sin enzima maceradora, 971 LAU/g	< 0,002

Nivel umbral de celulasa en aplicación de yogur

Para establecer un nivel umbral de celulasa para aplicación de yogur, se usó bebida de yogur tratada con el control de celulasa usado para el ensayo de viscosidad. Se separó en alícuotas de 5 ml una bebida de yogur (MILRAM, bebida de kefir, Erdbeere; BB 14-02-14) en vasos Wheaton por duplicado para cada muestra. Se diluyó adicionalmente una dilución madre de (0,081ml en 1000ml) en cuatro nuevas muestras por un factor de 10. Se añadieron 100µl de cada muestra así como 100µl de H₂Odd para las muestras de blanco a cada uno de los 5 ml de yogur. Después, se almacenaron las muestras a 4°C o 40°C. En varios instantes, se midió la viscosidad usando el dispositivo Viscoman a la velocidad 2.

La viscosidad relativa se representó frente al tiempo (**a**) horas **b**) días) de incubación a **a**) 40°C o **b**) 4°C de la muestra de dilución. Para cada dilución, se indican las CMCU/ml de yogur.

Los resultados se representan como viscosidad relativa representada frente al tiempo de incubación a 40°C (fig. 5a) o 4°C (fig. 5b). Las curvas muestran un desarrollo similar frente al tiempo, lo que indica que la incubación a 40°C

podría usarse a modo de ensayo acelerado en lugar del laborioso ensayo de incubación a 4°C.

Para calcular los niveles umbral, se definió que el nivel aceptable de actividad de celulasa podría reducir la viscosidad menos de un 10% durante el tiempo de almacenamiento. Basándose en los datos mostrados en la fig. 5b, se calculó la actividad específica (reducción de la viscosidad relativa/CMCU/por ml de yogur/h) para cada punto de datos asumiendo que la máxima actividad específica observada representaría la velocidad inicial.

Se observó que la máxima actividad específica era de 9.6 reducción de la viscosidad relativa/CMCU/por ml de yogur/h, lo que significa que la viscosidad podía reducirse un 960%. CMCU en un ml de yogur cada hora. Por tanto, puede calcularse el nivel umbral de CMCU/ml que permite una reducción del 10% de la viscosidad durante varios periodos de almacenamiento (véase la tabla 7).

Nivel umbral = $0,1 / (\text{actividad específica} \times \text{horas de almacenamiento})$

Para el almacenamiento durante 1 mes, el nivel umbral se calcula del modo siguiente; $0.1 / (9.6 \times 720) = 1,45 \times 10^{-5}$

Tabla 7

Control de celulasa. 960% reducción de la viscosidad/h/CMCU/ml

tiempo de almacenamiento a 4°C (meses)	Horas	Reducción de la visc. x hora	Umbral (CMCU/ml de yogur) (reducción de la visc. máx. del 10%)
9	6480	62208	1,61E-06
8	5760	55296	1,81E-06
7	5040	48384	2,07E-06

6	4320	41472	2,41E-06
5	3600	34560	2,89E-06
4	2880	27648	3,62E-06
3	2160	20736	4,82E-06
2	1440	13824	7,23E-06
1	720	6912	1,45E-05
14 días	336	3226	3,10E-05

Comparando los cálculos con los datos en la figura 5b se observa que se correlacionan con los datos obtenidos para todas las diluciones incubadas durante un periodo de 1 mes a 4°C. Los niveles de 3.6×10^{-6} CMCU/ml o menores no redujeron la viscosidad más de un 10% en un mes, mientras que más de 3.6×10^{-6} CMCU/ml redujo la viscosidad en más de un 10%.

Conclusión

Los genes de pectinasa, celulasa y mananasa se han eliminado génicamente de manera eficaz de la cepa hospedadora.

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan al presente documento por referencia. Serán evidentes varias modificaciones y variaciones de los métodos y el sistema descrito de la presente invención para los expertos en la materia sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse de manera indebida a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son evidentes para los expertos en química, bioquímica,

biología o campos relacionados se encuentren dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Lista de secuencias

>SEQ ID NO: 1 (BIF_917)

5 vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtstfdanwkwfmlsdsvqaqdpaf
ddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpgggtgwyksftidrdlagkriainfdg
vymnatvwfngvklgthpygysspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgi
yrdvtltvtdgvhvgngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
pkggktdaaigtvttasksiaagasadvsttitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
10 vldtydteygfrrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiag
dnavlggdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklv
awtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdganydkirtthps
waiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfv
15 agtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnd
dvhtlhlilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyftpkgstekrligeksftkkt
taagytyqvyegsddstahknmyltnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasv
tttgkaaklkadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvg
vdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavp
20 gtstekt

>SEQ ID NO: 2 (BIF_995)

 vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtstfdanwkwfmlsdsvqaqdpaf
ddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpgggtgwyksftidrdlagkriainfdg
vymnatvwfngvklgthpygysspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgi
25 yrdvtltvtdgvhvgngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
pkggktdaaigtvttasksiaagasadvsttitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
vldtydteygfrrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiag
dnavlggdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklv
30 awtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdganydkirtthps
waiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfv

agtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswwpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnd
dvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyftpkgstekrligeksftkkt
taagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasv
tttgkaaklkadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvg
5 vdnngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavp
gtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsddevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakag
sfsvagtvagqkisvrvtmideigal

>SEQ ID NO: 3 (BIF_1068)

Vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtssdfdanwkwfmlsdsvqaqdpaf
10 ddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpggtgwyksftidrdlagkriainfdg
vymnatvwfngvklgthpygysspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgi
yrdvtltvtdgvhvgngngaiktptslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
pkggktdaaigtvttasksiaagasadvsttitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
vldtydteygrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
15 qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiag
dnavlggdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklv
awtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdganydkirtthps
waiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwavassawydvvqrdfv
agtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswwpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnd
20 dvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyftpkgstekrligeksftkkt
taagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasv
tttgkaaklkadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvg
vdnngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavp
gtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsddevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakag
25 sfsvagtvagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanf
avhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvq

>SEQ ID NO: 4 (BIF_1172)

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtssdfdanwkwfmlsdsvqaqdpaf
ddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpggtgwyksftidrdlagkriainfdg
30 vymnatvwfngvklgthpygysspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgi
yrdvtltvtdgvhvgngngaiktptslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf

pkggktdaaigtvttasksiaagasadvststitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
vldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiag
dnavlggdkdetwakfdltstinrdrnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklv
5 awtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvgtnysdganydkirtthps
waiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfv
agtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnd
dvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyftpkgstekrligeksftkkt
taagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasv
10 tttgkaaklkadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvg
vdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavp
gtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakag
sfsvagt vagqkisvrvtmideigallnysastpvgt pavlpgsrpavlpdgtvtsanf
avhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsgnalrltq
15 nipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqq
lqqivmyffrdsnavrfpdagtktkiqi

>SEQ ID NO: 5 (BIF_1241)

vedatrdssttqmsstpevyssavdskqnrtssdfdanwkfmlsdsvqaqdpaf
ddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpgggtgwyksftidrdragkriainfdg
20 vymnatvwfngvklgthpygyfspfsdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgi
yrdvtltvtdgvhvgngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
pkggktdaaigtvttasksiaagasadvststitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
vldtydteygfrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiag
25 dnavlggdkdetwakfdltstinrdrnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklv
awtkaadstrpmtygdnkikanwnesntmgdnltanggvgtnysdganydkirtthps
waiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfv
agtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnd
dvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyftpkgstekrligeksftkkt
30 taagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasv
tttgkaaklkadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvg

vdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavp
gtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakag
sfsvagtvagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanf
avhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsgnalrltq
5 nipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqq
qqivmyffrdsnavrfrpdagktkiqisadgknwtdlaaetiaaqessdrvkytydfa
pvgatfvkvtvtnadtttsgvvcaglteielktat

>SEQ ID NO: 6 (BIF_1326)

vedatrsdsttqmsstpevyssavdskqnrtssdfdanwkwfmlsdsqvqaqdpaf
10 ddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpgggtgwyksftidrdlagkriainfdg
vymnatvwfngvklgthpygyfspfsdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgi
yrdvtltvtdgvhvgnngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
pkggktdaaigtvttasksiaagasadvsttitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
vldtydteygrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
15 qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiag
dnavlggdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklv
awtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltanggvvgtnysdganydkirtthps
waiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfv
agtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswwpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnd
20 dvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyftpkgstekrligeksftkkt
taagytyqvyegsddstahknmyltwnvpwaegtisaeaydenrlipegstegnasv
tttgkaaklkadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvg
vdngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavp
gtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdgtsdrqnvtwdavsddqiakag
25 sfsvagtvagqkisvrvtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanf
avhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsgnalrltq
nipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqq
qqivmyffrdsnavrfrpdagktkiqisadgknwtdlaaetiaaqessdrvkytydfa
pvgatfvkvtvtnadtttsgvvcaglteielktatskfvtntsaaalssltvngtkvsv
30 svlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtvlpahdnvirvitesedhvtrktftinlgte
gef

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

qnrtsd f d a n w k f m l s d s v q a q d p a f d d s a w q q v d l p h d y s i t q k y s q s n e a e s
a y l p g g t g w y r k s f t i d r d l a g k r i a i n f d g v y m n a t v w f n g v k l g t h p y g y s p f s f d l
5 t g n a k f g g e n t i v v k v e n r l p s s r w y s g s g i y r d v t l t v t d g v h v g n n g v a i k t p s l a t
q n g g d v t m n l t t k v a n d t e a a a n i t l k q t v f p k g g k t d a a i g t v t t a s k s i a a g a s a d v
t s t i t a a s p k l w s i k n p n l y t v r t e v l n g g k v l d t y d t e y g f r w t g f d a t s g f s l n g e k
v k l k g v s m h h d q g s l g a v a n r r a i e r q v e i l q k m g v n s i r t t h n p a a k a l i d v c n e k g v
l v v e e v f d m w n r s k n g n t e d y g k w f g q a i a g d n a v l g g d k d e t w a k f d l t s t i n r d r n a
10 p s v i m w s l g n e m m e g i s g s v s g f p a t s a k l v a w t k a a d s t r p m t y

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

g c a g t t g a a g a t g c a a c a a g a a g c g a t a g c a c a a c a c a a a t g t c a t c a a c a c c g
g a a g t t g t t t a t t c a t c a g c g g t c g a t a g c a a c a a a a t c g c a c a a g c g a t t t t g a t g c
15 g a a c t g g a a a t t t a t g c t g t c a g a t a g c g t t c a a g c a c a a g a t c c g g c a t t t g a t g a t t
c a g c a t g g c a a c a a g t t g a t c t g c c g c a t g a t t a t a g c a t c a c a c a g a a a t a t a g c c a a
a g c a a t g a a g c a g a a t c a g c a t a t c t t c c g g g a g g c a c a g g c t g g t a t a g a a a a g c t t
t a c a a t t g a t a g a g a t c t g g c a g g c a a a c g c a t t g c g a t t a a t t t t g a t g g c g t c t a t a
t g a a t g c a a c a g t c t g g t t t a a t g g c g t t a a a c t g g g c a c a c a t c c g t a t g g c t a t t c a
20 c c g t t t t c a t t t g a t c t g a c a g g c a a t g c a a a a t t t g g c g g a g a a a c a c a a t t g t c g t
c a a a g t t g a a a a t a g a c t g c c g t c a t c a a g a t g g t a t t c a g g c a g c g g c a t t t a t a g a g
a t g t t a c a c t g a c a g t t a c a g a t g g c g t t c a t g t t g g c a a t a a t g g c g t c g c a a t t a a a
a c a c c g t c a c t g g c a a c a c a a a a t g g c g g a g a t g t c a c a a t g a a c c t g a c a a c a a a a g t
c g c g a a t g a t a c a g a a g c a g c a g c g a a c a t t a c a c t g a a a c a g a c a g t t t t t c c g a a a g
25 g c g g a a a a a c g g a t g c a g c a a t t g g c a c a g t t a c a a c a g c a t c a a a a t c a a t t g c a g c a
g g c g c a t c a g c a g a t g t t a c a a g c a c a a t t a c a g c a g c a a g c c c g a a a c t g t g g t c a a t
t a a a a a c c c g a a c c t g t a t a c a g t t a g a a c a g a a g t t c t g a a c g g a g g c a a a g t t c t g g
a t a c a t a t g a t a c a g a a t a t g g c t t t c g t g g a c a g g c t t t g a t g c a a c a t c a g g c t t t
t c a c t g a a t g g c g a a a a a g t c a a a c t g a a a g g c g t t a g c a t g c a t c a t g a t c a a g g c t c
30 a c t t g g c g c a g t t g c a a a t a g a c g c g c a a t t g a a a g a c a a g t c g a a a t c c t g c a a a a a
t g g g c g t c a a t a g c a t t c g c a c a a c a c a t a a t c c g g c a g c a a a a g c a c t g a t t g a t g t c

tgcaatgaaaaaggcgttctgggtgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaa
aaatggcaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatg
cagttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaatt
aaccgcgatagaaatgcaccgtcagttattatgtgggtcactgggcaatgaaatgatgga
5 aggcatttcagggtcagtttcaggctttccggcaacatcagcaaaactggttgcatgga
caaaagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaac
tggaacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaattggcggagttgttggcac
aaattattcagatggcgcaaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaa
tttatgggtcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcattttataatagaacaaca
10 ggcggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctg
gggagcagttgcatcatcagcatgggtatgatgttgttcagagagattttgtcgcaggca
catatgtttggacaggatttgattatctggggaaccgacaccgtggaatggcacaggc
tcaggcgcagttgggtcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatac
agcaggctttccgaaagatacatattatttttatcagagccagtgggaatgatgatgttc
15 atacactgcatatttcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaat
aatgttccggttgtcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaa
aggctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaatcatttacaaaaaaacaacagcgg
caggctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaac
atgtatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaaagcgtatga
20 tgaaaataatcgcttgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacatcagttacaaca
caggcaaagcagcaaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggc
aaagatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaattggccatattgttccgga
tgcagcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaaactggttggcgttgata
atgggtcatcacccgatcatgattcatatcaagcggataaaccgcaaagcattttcaggc
25 aaagtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaa
agcagatggcctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaaca
gcacagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaactattatgtcaaaacaggc
aacaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatag
acaaaacgttacatgggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcatttt
30 cagttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtcaccaatgattgatgaa
attggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccgggtggcacaccggcagttcttcc

gggatcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtc
attggacaaaaccggcagatacagtcctataatacagcaggcacagtcaaagtaccggga
acagcaacagtttttggcaaagaattttaagtcacagcgacaatttagagttcaaagaag
ccaagttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcaactgagactgacacaaaatattc
5 cggcagataaacaatcagatacactggatgcgattaaagatggctcaacaacagttgat
gcaaatacaggcggaggcgcaaattccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagc
aggccataacacagcggaaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactgggccaga
tcgtcatgtatttttttcgcatagcaatgcagttagatttccggatgctggcaaaaca
aaaattcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcagcaacagaaacaat
10 tgcagcgcagaatcaagcgatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccgggtg
gcgcaacatttgttaaagtgacagtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcggt
gtttgcgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgcagaagcaaatttgtcacaaa
tacatcagcagcactgtcatcacttacagtcaatggcacaaaagtttcagattcagttc
tggcagcaggctcatataacacaccggcaattatcgcagatgttaaagcggaaggcgaa
15 ggcaatgcaagcgttacagtccttccggcacatgataatgttattcgcgtcattacaga
aagcgaagatcatgtcacacgcaaaacatttacaatcaacctgggcacagaacaagaat
ttccggctgattcagatgaaagagattatccggcagcagatatgacagtcacagttggc
tcagaacaaacatcaggcacagcaacagaaggaccgaaaaaatttgcagtcgatggcaa
cacatcaacatatttggcatagcaattggacaccgacaacagttaatgatctgtggatcg
20 cgtttgaactgcaaaaaccgacaaaactggatgcaactgagatatcttccgcgtccggca
ggctcaaaaaatggcagcgtcacagaatataaagttcagggtgtcagatgatggaacaaa
ctggacagatgcaggctcaggcacatggacaacggattatggctggaaactggcggaat
ttaatcaaccggtcacaacaaaacatgttagactgaaagcgggttcatacatatgcagat
agcggcaacgataaatttatgagcgcgaagcgaaattagactgagaaaagcggtcgatac
25 aacggatatttcaggcgcgaacagttacagttccggcaaaaactgacagttgatagagttg
atgcagatcatccggcaacatttgcacaaaagatgtcacagttacactgggagatgca
aactgagatatggcgttgattatctgctggattatgcaggcaatacagcagttggcaa
agcaacagtgacagtttagaggcattgataaatattcaggcacagtcgcgaaaacattta
caattgaactgaaaaatgcaccggcaccggaaccgacactgacatcagttagcgtcaaa
30 acaaaaccgagcaaaactgacatatgttgtcggagatgcatttgatccggcaggcctggt
tctgcaacatgatagacaagcagatagacctccgcaaccgctggttggcgaacaagcgg

atgaacgcggactgacatgcggcacaagatgcgatagagttgaacaactgcgcaaacat
gaaaatagagaagcgcataagaacaggcctggatcatctggaatttggtggcgagcaga
tgggcgagttggagaacaagcaacatttaaagtccatgtccatgcagatcagggagatg
gcagacatgatgatgcagatgaacgcgatattgatccgcatgttccggtcgatcatgca
5 gttggcgaactggcaagagcagcatgccatcatgttattggcctgagagtcgatacaca
tagacttaaagcaagcggcctttcaaattccggctgatgatatggcagaaatcgatcgca
ttacaggcctttcatcgttttgaacgccatgtc

**>SEQ ID NO: 9 secuencia de nucleótidos que codifica
BIF_917**

10 gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaaatgtcatcaacaccggaa
gttgtttattcatcagcggtcgatagcaaacaaaatcgcacaaagcgattttgatgcgaa
ctggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcag
catggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagc
aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtatagaaaaagctttac
15 aattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcggttaaactgggcacacatccgtatggctattccaccg
ttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaaatttggcggagaaaacacaattgtcgtcaa
agttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaaca
20 ccgtcactggcaacacaaaatggcggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgc
gaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaaggcg
gaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggc
gcatcagcagatgttacaagcacaattacagcagcaagcccgaactgtggtcaattaa
aaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaagttctggata
25 catatgatacagaatatggctttcgtggacaggctttgatgcaacatcaggcttttca
ctgaatggcgaaaaagtcaaactgaaaggcgttagcatgcatcatgatcaaggctcact
tgggcgagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgg
gcgtcaatagcatttcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgc
aatgaaaaaggcgttctggttgctgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaa
30 tggcaacacggaagatttatggcaaatggtttgccaagcaattgcaggcgataatgcag
ttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaac

cgcgatagaaatgcaccgtcagttattatgtggctcactgggcaatgaaatgatggaagg
catttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaaaactgggttgcacatggacaa
aagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactgg
aacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttggttggcacaaa
5 ttattcagatggcgcaaaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaattt
atggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcattttataatagaacaacaggc
ggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctgggg
agcagttgcatcatcagcatgggtatgatgttggttcagagagattttgtcgcaggcacat
atgtttggacaggatttgattatctggggaaccgacaccgtggaatggcacagggtca
10 ggcgcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcggttgatacagc
aggctttccgaaagatacatattatttttatcagagccagtggaaatgatgatgttcata
cactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttggttgcaaaaggctcaggcaataat
gttccgggttgctggtttatacagatgcagcgaaagtgaactgtatttttacaccgaaagg
ctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaatcatttacaaaaaaaacaacagcggcag
15 gctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaaacatg
tatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgatgatga
aaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacatcagttacaacaacag
gcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggcaaa
gatctgtcatatatattgaagtgcgatgtcacagatgcaaatggccatatgttccgggatgc
20 agcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaaactgggttggcgttgataatg
gctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcatttttcaggcaaa
gtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagc
agatggcctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagca
cagaaaaaaca

25 **>SEQ ID NO: 10 secuencia de nucleótidos que codifica
BIF_995**

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaaacacaaatgtcatcaacaccggaa
gttggtttattcatcagcggctcgatagcaaaacaaaatcgcacaaagcgattttgatgcgaa
ctggaaattttatgctgtcagatagcgttcaagcacaaagatccggcatttgatgattcag
30 catggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagc
aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctgggtatagaaaaagctttac

aattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaatTTTTgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccg
TTTTcatttgatctgacaggcaatgcaaaaTTTggcggagaaaaacacaattgtcgtcaa
agttgaaaatagactgccgtcatcaagatggTattcaggcagcggcatttatagagatg
5 ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaaaca
ccgtcactggcaacacaaaatggcggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgc
gaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtTTTTccgaaaggcg
gaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggc
gcatcagcagatgttacaagcacaaattacagcagcaagcccgaaactgtggTcaattaa
10 aaaccCGaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaagttctggata
catatgatacagaatatggctttcgttgacaggctttgatgcaacatcaggcttttca
ctgaatggcgaaaaagtcaaactgaaaggcgTtagcatgcatcatgatcaaggctcact
tggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgg
gcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgc
15 aatgaaaaaggcgTtctggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaa
tggaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgcag
ttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaac
cgcgatagaaatgcaccgtcagttattatgtggTcactgggcaatgaaatgatggaagg
catttcagggtcagtttcagggtttccggcaacatcagcaaaaactggTtgcatggacaa
20 aagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactgg
aacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttgttggcacaaa
ttattcagatggcgcaaaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaattt
atggTcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcattttataatagaacaacaggc
ggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctgggg
25 agcagttgcatcatcagcatggTatgatgttgttcagagagattttgtcgcaggcacat
atgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgcacaccgtggaatggcacagggtca
ggcgcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctatTTTggcatcgTtgatacagc
aggctttccgaaagatacatattatTTTTatcagagccagtggaatgatgatgttcata
cactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttgttgcaaaaggctcaggcaataat
30 gttccggTtgtcgTttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtatTTTtacaccgaaagg
ctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaatcattttacaaaaaaaacaacagcggcag

gctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaaacatg
tatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcggaagcgtatgatga
aaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacgttacaacaacag
gcaaagcagcaaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggcaaa
5 gatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaattggccatattgttccggatgc
agcaaataagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaaactgggttgcggttgataatg
gctcatcacccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcatttttcaggcaaa
gtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagc
agatggcctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagca
10 cagaaaaaacagtcgcgcagcttttattacagccgcaactattatgtcaaaacagggaac
aaaccgattctgccgtcagatggtgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagaca
aaacgttacatgggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcag
ttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtcaccaatgattgatgaaatt
ggcgactg

15 **>SEQ ID NO: 11 secuencia de nucleótidos que codifica
BIF_1068**

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacacaacacaaaatgtcatcaacaccggaa
gttgttttattcatcagcggtcgatagcaaacaaaatcgcacaaagcgattttgatgcgaa
ctggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaaagatccggcatttgatgattcag
20 catggcaacaagttgatctgccgcagatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagc
aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtatagaaaaagctttac
aattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcggttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccg
ttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaatttggcggagaaaacacaattgtcgtcaa
25 agttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatggttggaataatggcgtcgcaattaaaca
ccgtcactggcaacacaaaatggcggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgc
gaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaaggcg
gaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggc
30 gcatcagcagatgttacaagcacaaattacagcagcaagcccgaactgtggtcaattaa
aaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaagttctggata

catatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttca
ctgaatggcgaaaaagtcaaactgaaaggcgtagcatgcatcatgatcaaggctcact
tggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgg
gcgtcaatagcattcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgc
5 aatgaaaaaggcgttctggttgctgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaa
tggaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgcag
ttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaac
cgcgatagaaatgcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaagg
catttcagggtcagtttcaggctttccggcaacatcagcaaaaactggttgcatggacaa
10 aagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactgg
aacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcggagttggttgacaaaa
ttattcagatggcgcaaaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaattt
atggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcattttataatagaacaacaggc
ggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctgggg
15 agcagttgcatcatcagcatggtatgatgttggtcagagagattttgctgcaggcacat
atgtttggacaggatttgattatctgggcgaaccgcacccgtggaatggcacagggtca
ggcgagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggtcatcgttgatacagc
aggctttccgaaagatacatattatttttatcagagccagtggaaatgatgatgttcata
cactgcatatttcttccggcatggaatgaaaatgttggttgcaaaagggtcaggcaataat
20 gttccggttgctcgtttatacagatgcagcgaaagtgaaactgtattttacaccgaaagg
ctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaatcatttacaaaaaaaacaacagcggcag
gctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaaacatg
tatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgtatgatga
aaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacatcagttacaacaacag
25 gcaaagcagcaaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggcaaa
gatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgc
agcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgaggcaaaactggttggcgttgataatg
gctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcattttcaggcaaa
gtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagc
30 agatggcctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagca
cagaaaaaacagtccgcagctttttattacagccgcaactattatgtcaaaacagggaac

aaaccgattctgccgtcagatggttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagaca
aaacgttacatgggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcag
ttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgctcacaatgattgatgaaatt
ggcgcactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccggg
5 atcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtcatt
ggacaaaaccggcagatacagtctataatacagcaggcacagtc aaagtaccgggaaca
gcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaa

**>SEQ ID NO: 12 secuencia de nucleótidos que codifica
BIF_1172**

10 gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaa
gttgtttattcatcagcggtcgatagcaaacaaaatcgcacaaagcgattttgatgcgaa
ctggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaaagatccggcatttgatgattcag
catggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagc
aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtatagaaaaagctttac
15 aattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
atgcaacagtcctggtttaatggcggttaaactgggcacacatccgtatggctattccacg
ttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaatttggcggagaaaacacaattgtcgtcaa
agttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcattgttggcaataatggcgtcgcaattaaaaca
20 ccgtcactggcaacacaaaatggcggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgc
gaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaaggcg
gaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggc
gcatcagcagatgttacaagcacaaattacagcagcaagcccgaactgtggtcaattaa
aaaccggaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaagttctggata
25 catatgatacagaatatggctttcgctggacaggctttgatgcaacatcaggcttttca
ctgaatggcgaaaaagtc aaactgaaaggcggttagcatgcatcatgatcaaggctcact
tggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgg
gcgtcaatagcatttcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgc
aatgaaaaaggcgttctggttgctgaagaagtc ttttgatatgtggaaccgcagcaaaaa
30 tggcaacacggaagatttatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgcag
ttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaac

cgcgatagaaatgcaccgtcagttattatgtggctcactgggcaatgaaatgatggaagg
catttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaaaactgggttgcacatggacaa
aagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaatttaaagcgaactgg
aacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcgagttggttggcacaaa
5 ttattcagatggcgcaaaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaattt
atggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcattttataatagaacaacaggc
ggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctgggg
agcagttgcatcatcagcatggtatgatgttggttcagagagattttgtcgcaggcacat
atgtttggacaggattttgattatctggggaaccgacaccgtggaatggcacagggtca
10 ggcgcagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagc
aggctttccgaaagatacatattatttttatcagagccagtggaatgatgatgttcata
cactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttggttgcaaaaggctcaggcaataat
gttccggttgctcgttttatacagatgcagcgaaagtgaactgtatttttacaccgaaagg
ctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaatcatttacaaaaaaaacaacagcggcag
15 gctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaaacatg
tatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgatgatga
aaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacatcagttacaacaacag
gcaaagcagcaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggcaaa
gatctgtcatatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatatgttccggatgc
20 agcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgcaggcaaaactgggttggcgttgataatg
gctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcatttttcaggcaaa
gtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagc
agatggcctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagca
cagaaaaaacagtccgcagctttttattacagccgcaactattatgtcaaaacagggaac
25 aaaccgattctgccgtcagatggttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagaca
aaacgttacatgggatgcagttttcagatgatcaaattgcaaaagcagggtcatttttcag
ttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtcacaatgattgatgaaatt
ggcgactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccggg
atcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaatttttcagtcatt
30 ggacaaaaccggcagatacagtcctataatacagcaggcacagtc aaagtaccgggaaca
gcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagcca

agttacaattggctcatcagttttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccgg
cagataaacaatcagatacactggatgcgattaaagatggctcaacaacagttgatgca
aatacaggcgaggcgcaaatccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagcagg
ccataacacagcggaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactggggccagatcg
5 tcatgtatttttttcgcatagcaatgcagtttagatttccggatgctggcaaaaacaaaa
attcagatc

**>SEQ ID NO: 13 secuencia de nucleótidos que codifica
BIF_1241**

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaa
10 gttgtttattcatcagcggtcgatagcaaaaaatcgcaacgagcattttgatgcgaa
ctggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaagatccggcatttgatgattcag
catggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagc
aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtatagaaaaagctttac
aattgatagagatctggcaggcaaacgcattgcgattaattttgatggcgtctatatga
15 atgcaacagtctggtttaatggcgttaaactgggcacacatccgtatggctattcaccg
ttttcatttgatctgacaggcaatgcaaaatttgcgaggagaaaacacaattgtcgtcaa
agttgaaaatagactgccgtcatcaagatggatttcaggcagcggcatttatagagatg
ttacactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgctcgcaattaaaca
ccgtcactggcaacacaaaatggcgagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgc
20 gaatgatacagaagcagcagcgaacattacactgaaacagacagtttttccgaaaggcg
gaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggc
gcatcagcagatgttacaagcacaattacagcagcaagcccgaactgtgggtcaattaa
aaaccggaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaagttctggata
catatgatacagaatatggctttcgttgacaggctttgatgcaacatcaggcttttca
25 ctgaatggcgaaaaagtcaaactgaaaggcgtttagcatgcatcatgatcaaggctcact
tgggcgagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgg
gcgtcaatagcatttcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgc
aatgaaaaaggcgttctggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaa
tggaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgcag
30 ttctgggaggcgataaagatgaaacatggggcgaaatttgatcttacatcaacaattaac
cgcatagaaatgcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaagg

catttcaggctcagtttcaggctttccggcaacatcagcaaaaactggttgcatggacaa
aagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactgg
aacgaatcaaatacaatggggcgataatctgacagcaaatggcgaggattggttgacacaaa
ttattcagatggcgcaaaactatgataaaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaattt
5 atggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcattttataatagaacaacaggc
ggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctgggg
agcagttgcatcatcagcatgggtatgatgttggttcagagagattttgtcgcaggcacat
atgtttggacaggatttgattatctgggCGAACCGACACCGTGGAATGGCACAGGCTCA
ggcgagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagc
10 aggctttccgaaagatacatattatttttatcagagccagtggaaatgatgatgttcata
cactgcatattcttccggcatggaaatgaaaatgttggttgcaaaaggctcaggcaataat
gttccggttgctcgtttatacagatgcagcgaagtgaactgtattttacaccgaaagg
ctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaatcatttacaaaaaaaacaacagcggcag
gctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaaacatg
15 tatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgtatgatga
aaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcacatcagttacaacaacag
gcaaagcagcaaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggcaaa
gatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgc
agcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgaggcaaaactggttggcgttgataatg
20 gctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcattttcaggcaaa
gtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagc
agatggcctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagca
cagaaaaaacagtcgcgagcttttattacagccgcaactattatgtcaaaacagggaac
aaaccgattctgccgtcagatgttgaagttcgctattcagatggaacaagcgatagaca
25 aaacgttacatgggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcaggctcattttcag
ttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcgcgtcacaatgattgatgaaatt
ggcgactgctgaattattcagcaagcacaccggttggcacaccggcagttcttccggg
atcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgcagtccatt
ggacaaaaccggcagatacagtctataatacagcaggcacagtcaaagtaccgggaaca
30 gcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgcacaattagagttcaaagaagcca
agttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccgg

cagataaacaatcagatacactggatgcgattaaagatgggtcaacaacagttgatgca
aatacaggcggaggcgcaaattccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagcagg
ccataacacagcggaaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactggggccagatcg
tcatgtatTTTTTTCGCGATAGCAATGCAGTTAGATTTCCGGATGCTGGCAAAACAAAA
5 attcagatcagcgcagatggcaaaaattggacagatctggcagcaacagaaacaattgc
agcgcaagaatcaagcgatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccggttggcg
caacatttgTTAAAGTGACAGTCAAAACGCAGATACAACAACACCGTCAGGCGTTGTT
tgcgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgaca

>SEQ ID NO: 14 secuencia de nucleótidos que codifica
10 **BIF_1326**

gttgaagatgcaacaagaagcgatagcacaacacaaatgtcatcaacaccggaa
gttgTTTTATTcatcagcggtcgatagcaaacaaaatcgcacaaagcgattttgatgcgaa
ctggaaatttatgctgtcagatagcgttcaagcacaaagatccggcatttgatgattcag
catggcaacaagttgatctgccgcatgattatagcatcacacagaaatatagccaaagc
15 aatgaagcagaatcagcatatcttccgggaggcacaggctggtatagaaaaagctttac
aattgatagagatctggcaggcaaacgcattgCGATTAATTTTgatggcgtctatatga
atgcaacagtctggtttaatggcgTTAAACTgggcacacatccgtatggctattcaccg
TTTTcatttgatctgacaggcaatgcaaaaatttggcggagaaaacacaattgtcgtcaa
agttgaaaatagactgccgtcatcaagatggtattcaggcagcggcatttatagagatg
20 ttactgacagttacagatggcgttcatgttggcaataatggcgtcgcaattaaacaa
ccgtcactggcaacacaaaatggcggagatgtcacaatgaacctgacaacaaaagtcgc
gaatgatacagaagcagcagcgaacattactgaaacagacagtttttccgaaaggcg
gaaaaacggatgcagcaattggcacagttacaacagcatcaaaatcaattgcagcaggc
gcatcagcagatgttacaagcacaaattacagcagcaagcccgaaactgtggtcaattaa
25 aaacccgaacctgtatacagttagaacagaagttctgaacggaggcaaagttctggata
catatgatacagaatatggctttcgttgacaggctttgatgcaacatcaggcttttca
ctgaatggcgaaaaagtcaaactgaaaggcgtttagcatgcatcatgatcaaggctcact
tggcgcagttgcaaatagacgcgcaattgaaagacaagtcgaaatcctgcaaaaaatgg
gcgtcaatagcatttcgcacaacacataatccggcagcaaaagcactgattgatgtctgc
30 aatgaaaaaggcgttctggttgtcgaagaagtctttgatatgtggaaccgcagcaaaaa
tggaacacggaagattatggcaaatggtttggccaagcaattgcaggcgataatgcag

ttctgggaggcgataaagatgaaacatgggcgaaatttgatcttacatcaacaattaac
cgcgatagaaatgcaccgtcagttattatgtggtcactgggcaatgaaatgatggaagg
catttcagggtcagtttcagggtttccggcaacatcagcaaaaactgggttgcattggacaa
aagcagcagattcaacaagaccgatgacatatggcgataacaaaattaaagcgaactgg
5 aacgaatcaaatacaatgggcgataatctgacagcaaatggcgaggttggtggcacaaa
ttattcagatggcgcaaaactatgataaaattcgtacaacacatccgtcatgggcaattt
atggctcagaaacagcatcagcgattaatagccgtggcatttataatagaacaacaggc
ggagcacaatcatcagataaacagctgacaagctatgataattcagcagttggctgggg
agcagttgcatcatcagcatgggtatgatgttggttcagagagattttgtcgcaggcacat
10 atgttttgacaggatttgattatctggggaaccgacaccgtggaatggcacagggtca
ggcgagttggctcatggccgtcaccgaaaaatagctattttggcatcgttgatacagc
aggctttccgaaagatacatattatttttatcagagccagtggaatgatgatgttcata
cactgcatattcttccggcatggaatgaaaatgttggttgcaaaaggctcaggcaataat
gttccggttgctcgtttatacagatgcagcgaaagtgaactgtattttacaccgaaagg
15 ctcaacagaaaaaagactgatcggcgaaaaatcatttacaaaaaaacaacagcggcag
gctatacatatcaagtctatgaaggcagcgataaagattcaacagcgcataaaaaacatg
tatctgacatggaatgttccgtgggcagaaggcacaatttcagcgggaagcgtatgatga
aaataatcgctgattccggaaggcagcacagaaggcaacgcatcagttacaacaacag
gcaaagcagcaaaaactgaaagcagatgcggatcgcaaaacaattacagcggatggcaaa
20 gatctgtcatatattgaagtcgatgtcacagatgcaaatggccatattgttccggatgc
agcaaatagagtcacatttgatgttaaaggcgaggcaaaactgggttggttgataatg
gctcatcaccggatcatgattcatatcaagcggataaccgcaaagcattttcaggcaaa
gtcctggcaattgttcagtcaacaaaagaagcaggcgaaattacagttacagcaaaagc
agatggcctgcaatcaagcacagttaaaattgcaacaacagcagttccgggaacaagca
25 cagaaaaaacagtccgcagcttttattacagccgcaactattatgtcaaaacaggcaac
aaaccgattctgccgtcagatgttggaagttcgctattcagatggaacaagcgatagaca
aaacgttacatgggatgcagtttcagatgatcaaattgcaaaagcagggtcattttcag
ttgcaggcacagttgcaggccaaaaaattagcgttcggtcacaatgattgatgaaatt
ggcgactgctgaattattcagcaagcacaccggttggtcacaccggcagttcttccggg
30 atcaagaccggcagtcctgccggatggcacagtcacatcagcaaattttgagtcatt
ggacaaaaccggcagatacagtcctataatacagcaggcacagtc aaagtaccgggaaca

gcaacagtttttggcaaagaatttaaagtcacagcgacaattagagttcaaagaagcca
agttacaattggctcatcagtttcaggaaatgcactgagactgacacaaaatattccgg
cagataaacaatcagatacactggatgcgattaaagatgggtcaacaacagttgatgca
aatacaggcgaggcgcaaattccgtcagcatggacaaattgggcatattcaaaagcagg
5 ccataacacagcggaattacatttgaatatgcgacagaacaacaactgggccagatcg
tcatgtatTTTTTTCGCGATAGCAATGCAGTTAGATTTCCGGATGCTGGCAAAACAAAA
attcagatcagcgagatggcaaaaattggacagatctggcagcaacagaaacaattgc
agcgcaagaatcaagcgatagagtcaaaccgtatacatatgattttgcaccggttggcg
caacatttgttaaagtgacagtcacaaacgcagatacaacaacaccgtcaggcggttgtt
10 tgcgcaggcctgacagaaattgaactgaaaacagcgacaagcaaatttgtcacaatac
atcagcagcactgtcatcacttacagtcaatggcacaaaagtttcagattcagttctgg
cagcaggctcatataacacaccggcaattatcgagatgttaaagcggaaggcgaaggc
aatgcaagcgttacagtccttcggcacatgataatgttattcgcgctattacagaaag
cgaagatcatgtcacacgcaaaacattttacaatcaacctgggacagaaacaagaattt

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

GGGGTAACTAGTGGGAAGATGCAACAAGAAG

>SEQ ID NO: 16 cebador inverso para BIF917

GCGCTTAATTAATTATGTTTTTCTGTGCTTGTTTC

20 **>SEQ ID NO: 17 cebador inverso para BIF995**

GCGCTTAATTAATTACAGTGCGCCAATTCATCAATCA

>SEQ ID NO: 18 cebador inverso para BIF1068

GCGCTTAATTAATTATTGAACTCTAATTGTCGCTG

>SEQ ID NO: 19 cebador inverso para BIF1241

25 GCGCTTAATTAATTATGTCGCTGTTTTCAGTTCAAT

>SEQ ID NO: 20 cebador inverso para BIF1326

GCGCTTAATTAATTAAATTTCTTGTTCTGTGCCCA

>SEQ ID NO: 21 cebador inverso para BIF1478

GCGCTTAATTAATTATCTCAGTCTAATTTGCTTGCGC

30 **>SEQ ID NO: 22 BIF1750 de Bifidobacterium bifidum**

vedatrsdsttqmsstpevvysavdskqnrtstfdanwkwfmlsdsvqaqdpaf
ddsawqqvdlphdysitqkysqsneaesaylpgggtgwyrksftidrdlagkriainfdg
vymnatvwfngvklgthpygyfspfsfdltgnakfggentivvkvenrlpssrwysgsgi
yrdvtltvtgdgvhvgngvaiktpslatqnggdvtmnlttkvandteaaanitlkqtvf
5 pkggktdaaigtvttasksiaagasadvsttitaaspklwsiknpnlytvrtevlnggk
vldtydteygrwtgfdatsgfslngekvklkgvsmhhdqgslgavanrraierqveil
qkmgvnsirtthnpaakalidvcnekglvveevfdmwnrskngntedygkwfgqaiag
dnavlggdkdetwakfdltstinrdnapsvimwslgnemmegisgsvsgfpatsaklv
awtkaadstrpmttygdnkikanwnesntmgdnltaggvvgtnysdganydkirtthps
10 waiygsetasainsrgiynrttggaqssdkqltsydnsavgwgavassawydvvqrdfv
agtyvwtgfdylgeptpwngtgsgavgswpspknsyfgivdtagfpkdttyfyqsqwnd
dvhtlhilpawnenvvakgsgnnvpvvvytdaakvklyftpkgstekrligeksftkkt
taagytyqvyegsdkdstahknmyltwnvpwaegtisaeaydennrlipegstegnasv
tttgkaaklkadadrktitadgkdlsyievdvtdanghivpdaanrvtfdvkgagklvg
15 vdnngsspdhdsyqadnrkafsgkvlaivqstkeageitvtakadglqsstvkiaattavp
gtstektvrsfyysrnyyvktgnkpilpsdvevrysdtgsdrqnvtdavsdqiaakag
sfsvagtvagqkisrvrtmideigallnysastpvgtpavlpgsrpavlpdgtvtsanf
avhwtkpadtvyntagtvkvpgtatvfgkefkvtatirvqrsqvtigssvsignalrltq
nipadkqsdtldaikdgsttvdantggganpsawtnwayskaghntaeitfeyateqq
20 gqivmyffrdsnavrfpdagktkiqisadgknwtdlaatetiaaqessdrvkytydfa
pvgatfvkvtvtnadtttsgvvcaglteielktatskfvtntsaalssltnvgtkvds
svlaagsyntpaiiadvkaegegnasvtvlpahdnvirvitesedhvtrktftinlge
qefpadsderdypaadmtvtvgseqtsgtategpkkfavdgntstywhsnwtpttvndl
wiafelqkptkladalrylprpagskngsvteykvqvssddgtnwtdagsgtwttdygwkl
25 aefnqpvttkhvrlkavhtyadsgndkfmsaseirlrkavdttdisgatvtvpakltvd
rvdadhpatfatkdvtvtlgdatlrygvdyllldyagntavgkatvtvrgidkysgtvak
tftielknapapeptltsvsvktkpskltyvvgdafdpaglvqhdrqadrppqplvge
qadergltcgtrcdrveqlrkhenreahrtgldhlefvgaadgavgeqatfkvhvhadq
gdgrhddaderdidphvpvdhavgelaraachhviglrvdthrlkasgfgqipaddmaei
30 dritgfhrferhvg

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

Vrskklwisllfalaliftmafgstssaqa

5 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

10

15

20

25

30