



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 511**

51 Int. Cl.:

C11B 3/00 (2006.01)

C11C 3/00 (2006.01)

C07F 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05761577 .5**

96 Fecha de presentación : **18.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1791933**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54

Título: **Método de desgomado.**

30

Prioridad: **16.07.2004 GB 0416035**
26.07.2004 US 591185 P
07.07.2005 GB 0513859

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

73

Titular/es: **DANISCO A/S**
Langebrogade 1, P.O. Box 17
1001 Copenhagen K., DK

72

Inventor/es: **Soe, Jorn, Borch y**
Turner, Mark

74

Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de desgomado

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Se hace referencia a las siguientes solicitudes relacionadas: solicitud de los Estados Unidos de número de serie 09/750 990 registrada el 20 de julio de 1999, solicitud de los Estados Unidos de número de serie 10/409 391, las solicitudes de patente internacional WO2004/064537, WO2004/064987, PCT/IB2004/004378 y PCT/IB2004/004374.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para desgomar enzimáticamente los aceites comestibles mediante una lípido aciltransferasa.

- 10 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de una o más lípido aciltransferasas.

La presente invención se refiere también al uso de una lípido aciltransferasa para el desgomado de los aceites comestibles.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

- 15 Tradicionalmente se han utilizado dos procedimientos para desgomar los aceites, que son los procedimientos de desgomado físico y de desgomado químico. En los años 90 se desarrolló el procedimiento de desgomado enzimático mediante el uso de la fosfolipasa pancreática. Como esta enzima no era *kosher*, se acabó sustituyendo la fosfolipasa por una fosfolipasa A1 microbiana (Lecitase UltraTM, Novozymes, Dinamarca). El procedimiento enzimático tiene varias ventajas con respecto a los procedimientos de desgomado físico o químico, que incluyen ahorro de costes, mayor rendimiento y menos perjuicios para el medio ambiente.

- 20 La patente de los Estados Unidos US 2004/0005399 se refiere a procedimientos para el tratamiento previo de aceites vegetales, tales como aceite de salvado de arroz, aceite de girasol y aceite de palma para el refinado físico.

- 25 La patente internacional WO 03/100044 se refiere al menos a 1 secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de aciltransferasa membranario activo independiente, en el que se ha eliminado y/o sustituido al menos 1 resto aminoacídico de la región transmembranaria en comparación con el polipéptido de la aciltransferasa original, en donde el polipéptido de aciltransferasa activo membranario independiente codificado produce ésteres de ácidos grasos y/o tioésteres de ácidos grasos, tales como triacilgliceroles, diacilgliceroles, monoacilgliceroles, fosfolípidos, glucolípidos, ésteres de ceras, glúcidos acilados, aminoácidos acilados y lisolípidos, por ejemplo lisofosfolípidos, lisolecitina.

- 30 Kim Clausen («New enzyme for degumming», *Oils and Fats International*, vol. 17, n.º. 4, junio de 2001, páginas 24-25) se refiere a una enzima de segunda generación para el desgomado, que se introdujo en la planta de procesamiento y molturación de Cereol en Mannheim, Alemania.

Kim Clausen (*Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) páginas 333-340) se refiere al desgomado enzimático de aceites mediante la fosfolipasa microbiana.

- 35 El número de acceso Q9F7Y6 a la base de datos EMBL del EBI XP002350670 de marzo de 2001 se refiere a una glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa depositada por Lachmann et al.

RESUMEN DE LOS ASPECTOS DE LA PRESENTE INVENCION

- 40 La presente invención da a conocer un procedimiento de desgomado enzimático de aceites comestibles, que comprende tratar el aceite comestible con una lípido aciltransferasa de manera que se transfiere un grupo acilo desde una parte principal del fosfolípido a uno o más acilos aceptores, en donde el aceptor de acilo es uno o más esteroides y/o estanoles, y en donde la lípido aciltransferasa se caracteriza por que:

a) la lípido aciltransferasa posee actividad aciltransferasa, que se define como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un dador de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y

- 45 b) la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los siguientes restos aminoacídicos: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S,

y en donde cuando se alinea tanto con la secuencia consenso de Pfam00657 y/o la SEQ ID n.º 37, la lípido aciltransferasa tiene un bloque GANDY.

En la presente memoria se describe por referencia una o más lípido aciltransferasas, una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16 y una lípido aciltransferasa que

comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 85% o más, más preferentemente del 90% o más, incluso más preferentemente del 95% o más, incluso más preferentemente del 98% o más, o incluso más preferentemente del 99% o más, con la SEQ ID n.º 16.

5 En otro aspecto más, la presente invención da a conocer el uso de una lípido aciltransferasa, en donde la lípido aciltransferasa se caracteriza por que:

a) la lípido aciltransferasa posee actividad aciltransferasa, que se define como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un dador de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y

10 b) la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los siguientes restos aminoácidos: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S,

y en donde cuando se alinea tanto con la secuencia consenso de Pfam00657 y/o la SEQ ID n.º 37, la lípido aciltransferasa tiene un bloque GANDY en el desgomado de aceites comestibles (i) para eliminar fosfolípidos (tales como fosfatidilcolina) y (ii) para aumentar la formación de ésteres de esteroides y/o ésteres de estanoles en el aceite, o (iii) eliminar fosfolípidos (tales como fosfatidilcolina) y para aumentar la formación de ésteres de esteroides y/o ésteres de estanoles en el aceite sin aumentar significativamente la cantidad de ácidos grasos libres en el aceite.

15

ASPECTOS PREFERENTES

La lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa natural o puede ser una lípido aciltransferasa variante.

20 Por ejemplo, la lípido aciltransferasa para uso en el método y los usos de la presente invención puede ser una que está descrita en los documentos WO2004/06453 o WO2004/064987, o PCT/IB2004/004378 o GB0513859.9, por ejemplo.

La terminología «lípido aciltransferasa» tal y como se utiliza en la presente memoria significa una enzima que tiene actividad aciltransferasa (generalmente clasificada como E.C. 2.3.1.x), mediante la cual la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a uno o más sustratos aceptores, tales como uno o más de los siguientes: un esteroles; un estanol; un glúcido; una proteína; una subunidad proteica; glicerol; preferentemente un esteroles y/o un estanol.

25

La lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención, o para uso en los métodos y/o usos de la presente invención, es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido (tal y como se define en la presente memoria) a uno o más de los siguientes sustratos aceptores de acilo: un esteroles o un estanol, preferentemente un esteroles.

30

Para algunos aspectos, el «aceptor de acilo» según la presente invención puede ser cualquier compuesto que comprende un grupo hidroxilo (-OH), tal como por ejemplo alcoholes polivalentes incluido el glicerol; esteroides, estanoles; glúcidos; hidroxiaácidos que incluyen ácidos de las frutas, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico y ácido ascórbico; proteínas o una subunidad de las mismas, tales como aminoácidos, hidrolizados proteicos y péptidos (proteína parcialmente hidrolizada) por ejemplo; y sus mezclas y sus derivados. Preferentemente, el «aceptor de acilo» de acuerdo con la presente invención no es agua.

35

El aceptor de acilo no es preferentemente un monoglicérido.

En un aspecto, la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en los métodos y/o usos de la presente invención, puede, al igual que es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroles y/o un estanol, ser capaz adicionalmente de transferir un grupo acilo desde un lípido a uno o más de los siguientes: un glúcido, una proteína, una subunidad proteica, glicerol.

40

Preferentemente, el sustrato lipídico sobre el que actúa la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención es uno o más de los siguientes lípidos: un fosfolípido, tal como una lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina.

Este lípido de sustrato se puede denominar en la presente memoria el «dador de acilo lipídico». La terminología lecitina tal y como se usa en la presente memoria abarca fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

45

Para algunos aspectos, preferentemente, el lípido de sustrato sobre el que la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en el método y/o usos de la presente invención actúa como un fosfolípido, tal como lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina.

50 Para algunos aspectos, preferentemente, la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en el método y/o usos de la presente invención es incapaz, o sustancialmente incapaz, de actuar sobre un triglicérido y/o un 1-monoglicérido y/o 2-monoglicérido.

Convenientemente, la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en el método y/o usos de la presente invención puede mostrar una o más de las siguientes actividades fosfolipásicas: actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32).

5 Convenientemente, para algunos aspectos, la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en el método y/o usos de la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo desde un fosfolípido a un esteroil y/o un estanol.

Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa de la presente invención o para uso en los métodos y/o usos de la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo desde un fosfolípido a un esteroil y/o un estanol para formar al menos un éster de esteroil y/o un éster de estanol.

10 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en el método y/o usos de la presente invención no muestra actividad triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3) o no muestra actividad triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3) significativa.

15 La lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en el método y/o usos de la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroil y/o a un estanol. Por tanto, en una realización, el «aceptor de acilo» de acuerdo con la presente invención puede ser tanto un esteroil como un estanol o una combinación de ambos esteroil y estanol.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención o para uso en los métodos y usos de la presente invención se caracteriza usando los siguientes criterios:

20 (i) la enzima posee actividad aciltransferasa, que se puede definir como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un dador de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y

(ii) la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los siguientes restos aminoácidos: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

25 Preferentemente, la X del motivo GDSX es L o Y. Más preferentemente, la X del motivo GDSX es L. Por lo tanto, preferentemente, la enzima de acuerdo con la presente invención comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDLS.

30 El motivo GDSX está comprendido por cuatro aminoácidos conservados. Preferentemente, la serina dentro del motivo es una serina catalítica de la enzima lípido aciltransferasa. Convenientemente, la serina del motivo GDSX puede estar en una posición que corresponde a la Ser-16 en la enzima lipolítica de *Aeromonas hydrophila* explicada en Brumlik y Buckley (*Journal of Bacteriology*, abril 1996, vol. 178, n.º 7, págs. 2060-2064).

Para determinar si una proteína tiene el motivo GDSX de acuerdo con la presente invención, la secuencia se compara preferentemente con los perfiles de modelos ocultos de Markov (perfiles de HMM) de la base de datos Pfam de acuerdo con los procedimientos explicados en los documentos WO2004/064537 o WO2004/064987.

35 Pfam es una base de datos de familias de dominios proteicos. Pfam contiene alineamientos de secuencias múltiples revisados a mano para cada familia, así como un perfil de modelos ocultos de Markov (perfiles de HMM) para identificar estos dominios en las secuencias nuevas. Se puede encontrar una introducción a Pfam en Bateman A et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30; 276-280. «Hidden Markov models are used in a number of databases that aim at classifying proteins», para una revisión, consulte Bateman A y Haft DH (2002) *Brief Bioinform* 3; 236-245. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=122300-32&dopt=Abstract, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11752314&dopt=Abstract.

Para una explicación detallada de los modelos ocultos de Markov y cómo se aplican en la base de datos Pfam, véase Durbin R, Eddy S, y Krogh A (1998) *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4. El paquete de programas Hammer se puede conseguir de la Universidad de Washington, St. Louis, EE.UU.

45 Alternativamente, el motivo GDSX se puede identificar con el paquete de programas Hammer, cuyas instrucciones están en Durbin R, Eddy S, y Krogh A (1998) *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4 y en las referencias que contiene, y el perfil de HMMER2 proporcionado dentro de esta especificación.

50 A la base de datos Pfam se puede acceder, por ejemplo, a través de varios servidores, que se encuentran actualmente localizados en los siguientes sitios web:

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>

<http://pfam.wustl.edu/>

<http://pfam.jouy.inra.fr/>

<http://pfam.cgb.ki.se/>

La base de datos ofrece la posibilidad de búsquedas mediante la introducción de una secuencia proteica. Usando los parámetros por defecto de la base de datos, se analizará la presencia de dominios Pfam en la secuencia proteica. El dominio GDSX es un dominio consolidado en la base de datos y, como tal, se detectará su presencia en cualquier secuencia de consulta. La base de datos devolverá el alineamiento de la secuencia consenso de Pfam00657 con la secuencia de consulta.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la invención se puede alinear con la secuencia consenso de Pfam00657 (para una explicación detallada, consulte los documentos WO2004/064537 o WO2004/064987).

Preferentemente, un emparejamiento positivo con el perfil de modelo oculto de Markov (perfil de HMM) de la familia del dominio Pfam00657 indica la presencia del dominio GDLS o GDSX de acuerdo con la presente invención.

Preferentemente, cuando se alinea con la secuencia consenso de Pfam00657, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos o usos de la invención puede tener al menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente más de dos, de los siguientes: un bloque GDSx, un bloque GANDY, un bloque HPT. Convenientemente, la lípido aciltransferasa tiene un bloque GDSx y un bloque GANDY. Alternativamente, la enzima puede tener un bloque GDSx y un bloque HPT. La enzima comprende al menos un bloque GDSx.

Preferentemente, los residuos del motivo GANDY se seleccionan entre GANDY, GGND, GGNDL, más preferentemente GANDY.

Preferentemente, cuando se alinea con la secuencia consenso de Pfam00657, la enzima para uso en los métodos o usos de la invención tiene al menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente más de dos, preferentemente más de tres, preferentemente más de cuatro, preferentemente más de cinco, preferentemente más de seis, preferentemente más de siete, preferentemente más de ocho, preferentemente más de nueve, preferentemente más de diez, preferentemente más de once, preferentemente más de doce, preferentemente más de trece, preferentemente más de catorce, de los siguientes restos aminoacídicos cuando se compara con la secuencia del polipéptido de referencia de *A. hydrophila*, a saber SEQ ID n.º 1: 28hid, 29hid, 30hid, 31hid, 32gly, 33Asp, 34Ser, 35hid, 130hid, 131Gly, 132Hid, 133Asn, 134Asp, 135hid, 309His.

El dominio GDSX de Pfam00657 es un identificador único que distingue las proteínas que poseen este dominio del resto de las enzimas.

La secuencia consenso de Pfam00657 se presenta en la figura 12 como SEQ ID n.º 2. Procede de la identificación de la familia 00657 de Pfam, versión 6 de la base de datos, que también se puede denominar en el presente documento pfam00657.6.

La secuencia consenso se puede actualizar con otras versiones de la base de datos Pfam (por ejemplo, véanse los documentos WO2004/064537 o WO2004/064987).

La presencia de los bloques GDSx, GANDY y HPT se encuentran en la familia 00657 de Pfam de las dos versiones de la base de datos. Las futuras versiones de la base de datos Pfam se pueden utilizar para identificar la familia 00657 de Pfam.

En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención se puede caracterizar usando los siguientes criterios:

(i) la enzima posee actividad aciltransferasa, que se puede definir como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un dador de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster;

(ii) la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los siguientes restos aminoacídicos: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S;

(iii) la enzima comprende His-309 o comprende un resto de histidina en una posición que corresponde a la His-309 en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* mostrada en las figuras 11 y 13 (SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 3).

Preferentemente, el resto aminoacídico del motivo GDSX es L.

En la SEQ ID n.º 3 o en la SEQ ID n.º 1, los primeros 18 restos aminoacídicos forman una secuencia señal. La His-309 de la secuencia completa, que es la proteína que incluye la secuencia señal, equivale a la His-291 de la parte madura de la proteína, esto es, la secuencia sin la secuencia señal.

En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención comprende el siguiente tríptico catalítico: Ser-34, Asp-134 e His-309, o comprende un resto de serina, un resto de ácido aspártico o un resto de histidina, respectivamente, en las posiciones que corresponden a Ser-34, Asp-134 e His-309 en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* presentada en la figura 13 (SEQ ID n.º 3) o en la figura 11 (SEQ ID n.º 1). Tal y como se declara más arriba, en la secuencia mostrada en la SEQ ID n.º 3 o la SEQ ID n.º 1, los primeros 18 restos aminoacídicos forman una secuencia señal. Ser-34, Asp-134 e His-309 de la secuencia completa, que es la proteína que incluye la secuencia señal, equivalen a Ser-16, Asp-116 e His-291 de la parte madura de la proteína, esto es, la secuencia sin la secuencia señal. En la secuencia consenso de pfam00657, tal y como se presenta en la figura 12 (SEQ ID n.º 2), los restos del centro activo corresponden a Ser-7, Asp-157 e His-348.

En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención se pueden caracterizar utilizando los siguientes criterios:

(i) la enzima posee actividad aciltransferasa, que se puede definir como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un dador de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y

(ii) la enzima comprende al menos Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309 o comprende restos de glicina, ácido aspártico, serina, ácido aspártico e histidina en las posiciones que corresponden a Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309, respectivamente, en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* mostrada en la figura 13 (SEQ ID n.º 3) o en la figura 11 (SEQ ID n.º 1).

Convenientemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención comprende uno o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

(i) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 3 (véase la figura 13)

(ii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 4 (véase la figura 14)

(iii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 5 (véase la figura 15)

(iv) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 6 (véase la figura 16)

(v) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 7 (véase la figura 17)

(vi) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 8 (véase la figura 18)

(vii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 9 (véase la figura 19)

(viii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 10 (figura 20)

(ix) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 11 (figura 21)

(x) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 12 (figura 22)

(xi) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 13 (figura 23)

(xii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 14 (figura 24)

(xiii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 1 (figura 11)

(xiv) la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 15 (figura 25) o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más con una cualquiera de las secuencias presentadas como SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, o SEQ ID n.º 15.

Convenientemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención comprende tanto la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 3 o como SEQ ID n.º 4 o SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 15 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 80% o más, preferentemente del 85% o más, preferentemente del 90% o más, preferentemente del 95% o más, con la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 3 o la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 4 o la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 1 o la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 15.

Convenientemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad del 80% o más, preferentemente del 85% o más, más preferentemente del 90% o más, e incluso más preferentemente del 95% o más, con una cualquiera de las secuencias presentadas como SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8,

SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, o SEQ ID n.º 15.

Convenientemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención comprende uno o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 5 (a) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 1 a 100 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1;
- (b) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 101 a 200 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1;
- 10 (c) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 201 a 300 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1; o
- (d) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 85% o más, más preferentemente del 90% o más, incluso más preferentemente del 95% o más, con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas más arriba en (a)-(c).

Convenientemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 15 (a) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 28 a 39 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1;
- (b) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 77 a 88 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1;
- 20 (c) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 126 a 136 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1;
- (d) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 163 a 175 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1;
- 25 (e) una secuencia de aminoácidos presentada como restos aminoacídicos 304 a 311 de la SEQ ID n.º 3 o de la SEQ ID n.º 1; o
- (f) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 85% o más, más preferentemente del 90% o más, incluso más preferentemente del 95% o más, con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas más arriba en (a)-(e).

30 En un aspecto, la lípido aciltransferasa para uso en el método y usos de la presente invención puede ser la lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis* como se explica en la EP 1 275 711. Así, en un aspecto, la lípido aciltransferasa para uso en el método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una de las secuencias de aminoácidos presentadas en la SEQ ID n.º 17 (figura 28) o en la SEQ ID n.º 18 (figura 29).

35 Con mucha más preferencia, la lípido aciltransferasa para uso en el método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16 (figura 10), o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 85% o más, más preferentemente del 90% o más, incluso más preferentemente del 95% o más, incluso más preferentemente del 98% o más, incluso más preferentemente del 99% o más, con la SEQ ID n.º 16. Esta enzima se podría considerar una enzima variante.

40 En un aspecto, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención puede ser una lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) o una variante de la misma (por ejemplo, una variante fabricada por evolución molecular).

45 Las LCAT adecuadas se conocen en la técnica y se pueden obtener de uno o más de los siguientes organismos, por ejemplo: mamíferos, ratas, ratones, pollos, *Drosophila melanogaster*, plantas, que incluyen *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, nematodos, hongos y levadura.

50 En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en el método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa obtenible, preferentemente obtenida, de cepas TOP 10 de *E. coli* que llevan pP et 12aAhydro y pPet12aASalmo depositadas por Danisco A/S de Langegrogade, DK-1001 Copenague K, Dinamarca, bajo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento en Materia de Patentes en la Colección Nacional de Bacterias Industriales, Marinas y Alimentarias (NCIMB), C/ San Machar 23, Aberdeen, Escocia, Gran Bretaña, el 22 de diciembre de 2003 con los números de acceso NICMB 41204 y NCIMB 41205, respectivamente.

Las lípido aciltransferasas para uso en los métodos de la presente invención altamente preferidas incluyen las aisladas de *Aeromonas spp.*, preferentemente *Aeromonas hydrophila* o *A. salmonicida*, más preferentemente *A. salmonicida*. Las más preferentes lípido aciltransferasas para uso en la presente invención están codificadas por las SEQ ID n.º 1, 3, 4, 15 y 16. El experto en la técnica reconocerá que es preferible que los péptidos señal de las aciltransferasas se hayan escindido durante la expresión de la transferasa. El péptido señal de las SEQ ID n.º 1, 3, 4, 15 y 16 son los aminoácidos 1 a 18. Por lo tanto, las regiones más preferentes son los aminoácidos 19 a 335 de la SEQ ID n.º 1 y de la SEQ ID n.º 3 (*A. hydrophila*) y los aminoácidos 19 a 336 de las SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 15 y SEQ ID n.º 16 (*A. salmonicida*). Cuando se usa para determinar la homología de identidad de las secuencias de aminoácidos, se prefiere que los alineamientos tal como se describen en la presente invención usen la secuencia madura.

Por lo tanto, las regiones más preferentes para determinar la homología (identidad) son los aminoácidos 19 a 335 para las SEQ ID n.º 1 y 3 (*A. hydrophila*) y los aminoácidos 19 a 336 para las SEQ ID n.º 4, 15 y 16 (*A. salmonicida*). Las SEQ ID n.º 34 y 35 son secuencias de proteínas maduras de las lípido aciltransferasas altamente preferentes de *A. hydrophila* y *A. salmonicida*, respectivamente.

Una lípido aciltransferasa para uso en la invención también se puede aislar de *Thermobifida*, preferentemente *T. fusca*, lo más preferentemente la codificada por la SEQ ID n.º 28.

Una lípido aciltransferasa para uso en la invención también se puede aislar de *Streptomyces*, preferentemente *S. avermitis*, lo más preferentemente la codificada por la SEQ ID n.º 32. Otras posibles enzimas para uso en la presente invención de *Streptomyces* incluyen las codificadas por las SEQ ID n.º 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 31 y 33. Los ejemplos muestran que la enzima codificada por la SEQ ID n.º 33 es muy eficaz para el desgomado.

Una enzima para uso en la invención también se puede aislar de *Corynebacterium*, preferentemente *C. efficiens*, lo más preferentemente la codificada por la SEQ ID n.º 29.

Convenientemente, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas como SEQ ID n.º 37, 38, 40, 41, 43, 45 o 47, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ellas, o codificada por una de las secuencias nucleotídicas presentadas como SEQ ID n.º 36, 39, 42, 44, 46 o 48, o una secuencia nucleotídica que tiene al menos una identidad del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ellas.

Preferentemente, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es una lípido aciltransferasa capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, en donde la enzima se puede obtener, preferentemente se obtiene, de especies de *Streptomyces*.

En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es preferentemente una lípido aciltransferasa capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, en donde la enzima está codificada por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

- a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID n.º 36;
- b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 36 por la degeneración del código genético; y
- c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID n.º 36.

En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es preferentemente una lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID n.º 37 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 60% con ella.

En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es preferentemente una lípido aciltransferasa capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, en donde la enzima comprende una secuencia de aminoácidos como la presentada en la SEQ ID n.º 37 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 60% con ella.

Preferentemente, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es preferentemente una lípido aciltransferasa capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, en donde la enzima se puede obtener, preferentemente se obtiene, de especies de *Thermobifida*, preferentemente *Thermobifida fusca*.

Preferentemente, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es

una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, en donde la enzima se puede obtener, preferentemente se obtiene, de especies de *Corynebacterium*, preferentemente *Corynebacterium efficiens*.

5 En una realización más, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas como SEQ ID n.º 37, 38, 40, 41, 43, 45 o 47, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ellas, o codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos presentadas como SEQ ID n.º 39, 42, 44, 46 o 48, o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ellas.

10 En una realización más, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas como SEQ ID n.º 38, 40, 41, 45 o 47, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ellas para los usos descritos en la presente memoria.

15 En otra realización más, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas como SEQ ID n.º 38, 40, o 47, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ellas para los usos descritos en la presente memoria.

20 Más preferentemente, en una realización, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 47, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ella.

25 En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 43 o 44, o una secuencia de aminoácidos con una identidad al menos del 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ellas.

En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 41, o una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% con ella.

30 En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, en donde la enzima está codificada por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID n.º 36;

35 b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 36 mediante la degeneración del código genético; y

c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad al menos del 70% con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID n.º 36.

40 En una realización, la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que se puede obtener, preferentemente que se obtiene, de las cepas L130 y L131 de *Streptomyces* depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenague K, Dinamarca, bajo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento en Materia de Patentes en la Colección Nacional de Bacterias Industriales, Marinas y Alimentarias (NCIMB), C/ San Machar 23, Aberdeen, Escocia, Gran Bretaña, el 25 de junio de 2004 con los números de acceso NICMB 41226 y
45 NCIMB 41227, respectivamente.

Las lípido aciltransferasas adecuadas para uso de acuerdo con la presente invención y/o los métodos de la presente invención pueden comprender una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos y/o ser codificada por las siguientes secuencias de nucleótidos:

un polinucleótido que codifica una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención (SEQ ID n.º 16);

50 una secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención (SEQ ID n.º 17).

Una enzima lípido aciltransferasa adecuada para uso en los métodos de la invención también se puede identificar mediante el alineamiento con la secuencia de la L131 (SEQ ID n.º 37) usando Align X, el algoritmo de alineamiento de dos en dos de Clustal W, de Vector NTI, con los ajustes por defecto.

Un alineamiento de la L131 y los homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* ilustra la conservación del motivo GDSx (GDSY en L131, *S. avermitilis* y *T. fusca*), de la caja GANDY, que es tanto GGNDa como GGNDL, y del bloque HPT (que se considera que es la histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados aparecen resaltados en la figura 61.

5 Cuando se alinea a la secuencia consenso de Pfam00657 de Pfam (como se describe en el documento WO04/0649) y/o la secuencia de L131 descrita en la presente memoria (SEQ ID n.º 37)), es posible identificar tres regiones conservadas: el bloque GDSx, el bloque GANDY y el bloque HPT (véase el documento WO04/064987 para más información).

10 Cuando se alinea a la secuencia consenso de Pfam00657 de Pfam (como se describe en el documento WO04/064987) y/o la secuencia de L131 descrita en la presente memoria (SEQ ID n.º 37)

i) La enzima lípido aciltransferasa de la invención, o para uso en los métodos de la invención, tiene preferentemente un motivo GDSx, más preferentemente un motivo GDSx seleccionado entre el motivo GDSL o el GDSY.

15 ii) La enzima lípido aciltransferasa de la invención, o para uso en los métodos de la invención, tiene preferentemente un bloque GANDY, más preferentemente un bloque GANDY que comprende los aminoácidos GGNDx, más preferentemente GGNDa o GGNDL.

y/o

iii) La enzima de la invención, o para uso en los métodos de la invención, tiene preferentemente un bloque HTP.

20 Y preferentemente

iv) La enzima galactolipasa/lípido aciltransferasa de la invención, o para uso en los métodos de la invención, tiene preferentemente un motivo GDSx o GDSY, y un bloque GANDY que comprende los aminoácidos GGNDx, preferentemente GGNDa o GGNDL, y un bloque HPT (histidina conservada).

25 Convenientemente, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa variante, en cuyo caso la enzima se puede caracterizar por que la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en donde X es uno o más de los restos aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y en donde la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con una secuencia madre en uno cualquiera o varios de los restos aminoácidos definidos en el conjunto 2, o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7 (definidos más adelante).

30 Por ejemplo, la enzima lípido aciltransferasa variante para uso en los métodos y usos de la presente invención se puede caracterizar por que la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en donde la X es uno o más de los restos aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y en donde la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con una secuencia madre en uno o más de los restos aminoácidos detallados en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7 (definidos más adelante) identificados por que dicha secuencia madre está estructuralmente alineada con el modelo estructural de P10480 definido en la presente memoria, que se obtiene preferentemente por el alineamiento estructural de las coordenadas estructurales del cristal de P10480 con 1IVN.PDB y/o 1DEO.PDB, como se explica en la presente memoria.

40 En una realización más, la enzima variante de lípido aciltransferasa para uso en los métodos o usos de la presente invención se puede caracterizar por que la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en donde X es uno o más de los restos aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y en donde la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con una secuencia madre en uno cualquiera o varios de los restos aminoácidos explicados en el conjunto 2 identificados cuando dicha secuencia madre está alineada con la secuencia consenso de Pfam (SEQ ID n.º 2, figura 12) y modificados de acuerdo con un modelo estructural de P10480 para asegurar el mejor solapamiento (véase la figura 30), tal y como se explica en la presente memoria.

45 Convenientemente, la enzima variante de lípido aciltransferasa puede comprender una secuencia de aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos se muestra como SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 19, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 25, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 27, SEQ ID n.º 28, SEQ ID n.º 29, SEQ ID n.º 30, SEQ ID n.º 32, o SEQ ID n.º 33, salvo por una o más modificaciones de aminoácido en uno cualquiera o varios de los restos aminoácidos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7 (que se definen más adelante) identificados por alineamiento de secuencias con la SEQ ID n.º 34.

55 Alternativamente, la enzima variante de lípido aciltransferasa puede ser una enzima variante que comprende una secuencia de aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos se muestra como SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 3, SEQ ID

n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 19, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 25, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 27, SEQ ID n.º 28, SEQ ID n.º 29, SEQ ID n.º 30, SEQ ID n.º 32, o SEQ ID n.º 33, salvo por una o más modificaciones de aminoácido en uno cualquiera o varios de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7 identificados mediante el alineamiento estructural de la secuencia madre con el modelo estructural de P10480 definido en la presente memoria, que se obtiene preferentemente mediante el alineamiento estructural de las coordenadas de la estructura cristalina de P10480 con 1IVN.PDB y/o 1DEO.PDB como se explica en la presente memoria.

Alternativamente, la enzima variante de lípido aciltransferasa puede ser una enzima variante que comprende una secuencia de aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos se muestra como SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 19, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 25, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 27, SEQ ID n.º 28, SEQ ID n.º 29, SEQ ID n.º 30, SEQ ID n.º 32, o SEQ ID n.º 33, salvo por una o más modificaciones de aminoácido en uno cualquiera o varios de los restos aminoacídicos explicados en el conjunto 2 identificados cuando dicha secuencia madre está alineada con la secuencia consenso de Pfam (SEQ ID n.º 2) y está modificada de acuerdo con un modelo estructural de P10480 para garantizar el mejor solapamiento (véase la figura 30) como se explica más adelante.

La terminología «que modifica» tal y como se utiliza en la presente memoria significa añadir, sustituir y/o eliminar. Preferentemente, la terminología «que modifica» significa «que sustituye».

Para evitar las dudas, cuando un aminoácido de la enzima madre está sustituido, está preferentemente sustituido por un aminoácido que es diferente al que se encuentra originalmente en dicha posición en la enzima madre, para así producir una enzima variante. En otras palabras, la terminología «sustitución» no pretende cubrir el reemplazo de un aminoácido por el mismo aminoácido.

Preferentemente, la enzima madre es una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 34 y/o SEQ ID n.º 15 y/o SEQ ID n.º 35.

Preferentemente, la enzima variante es una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos se muestra como SEQ ID n.º 34 o SEQ ID n.º 35, salvo por una o más modificaciones de aminoácido en uno cualquiera o varios de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7.

En una realización, la enzima variante comprende preferentemente una o más modificaciones de aminoácido en comparación con la enzima madre en al menos uno de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 4.

Convenientemente, la enzima variante comprende una o más de las siguientes modificaciones de aminoácido en comparación con la enzima madre:

S3E, A, G, K, M, Y, R, P, N, T o G

E309Q, R o A, preferentemente Q o R

-318Y, H, S o Y, preferentemente Y.

Preferentemente, la X del motivo GDSX es L. Por esta razón, la enzima madre comprende preferentemente el motivo de aminoácidos GDSL.

Preferentemente, el método para producir una enzima variante de lípido aciltransferasa comprende una o más de las siguientes etapas:

- 1) Cartografía por homología estructural o
- 2) Alineamiento por homología de secuencia.

Convenientemente, la cartografía por homología estructural puede comprender una o más de las siguientes etapas:

- i) alinear la secuencia madre con un modelo estructural (1IVN.PDB) presentado en la figura 46;
- ii) seleccionar uno o más restos aminoacídicos dentro de una esfera de 10 Å centrada en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47) (tal como uno o más restos aminoacídicos definidos en el conjunto 1 o en el conjunto 2); y
- iii) modificar uno o más aminoácidos seleccionados de acuerdo con la etapa (ii) en dicha secuencia madre.

En una realización, el residuo aminoacídico seleccionado puede residir dentro de una esfera de 9 Å, preferentemente de 8, 7, 6, 5, 4 o 3 Å, con centro en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el

centro activo (véase la figura 47).

Convenientemente, la cartografía de homología estructural puede comprender una o más de las siguientes etapas:

- i) alinear una secuencia madre con un modelo estructural (1IVN.PDB) presentado en la figura 46;
- 5 ii) seleccionar uno o más aminoácidos dentro de una esfera de 10 Å centrada en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47) (tal como uno o más restos aminoacídicos definidos en el conjunto 1 o en el conjunto 2);
- 10 iii) determinar si uno o más restos aminoacídicos seleccionados de acuerdo con la etapa (ii) están altamente conservados (en particular, si son restos del centro activo y/o parte del motivo GDSx y/o parte del motivo GANDY); y
- iv) modificar uno o más aminoácidos seleccionados de acuerdo con la etapa (ii), excluyendo las regiones conservadas identificadas de acuerdo con la etapa (iii) en dicha secuencia madre.

En una realización, el resto aminoacídico seleccionado puede residir dentro de una esfera de 9 Å, preferentemente de 8, 7, 6, 5, 4 o 3 Å, cuyo centro está en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47).

- 15 Alternativamente a, o en combinación con, la cartografía por homología estructural descrita más arriba, la cartografía de homología estructural se puede llevar a cabo seleccionando regiones específicas en lazo (LR) o regiones intermedias (IVR) deducidas del alineamiento de Pfam (alineamiento 2, figura 48) superpuesto con el modelo de P10480 y 1IVN. Las regiones en lazo (LR) o las regiones intermedias (IVR) se definen en la siguiente tabla:

	Posición del aminoácido en P10480 (SEQ ID n.º 34)
IVR1	1-19
Lazo1 (LR1)	20-41
IVR2	42-76
Lazo2 (LR2)	77-89
IVR3	90-117
Lazo3 (LR3)	118-127
IVR4	128-145
Lazo4 (LR4)	146-176
IVR5	177-207
Lazo5 (LR5)	208-287
IVR6	288-317

- 20 En algunas realizaciones de la presente invención, la enzima aciltransferasa variante para uso en los métodos y usos de la presente invención no solo comprende modificaciones de un aminoácido en uno o más de los aminoácidos definidos en uno cualquiera de los conjuntos 1 a 4 y 6 a 7, sino que también comprende al menos la modificación de un aminoácido en una o más de las regiones intermedias definidas más arriba (NR1-6) (preferentemente en una o más de las IVR 3, 5 y 6, más preferentemente en la IVR 5 o la IVR 6) y/o en una o más de las regiones en lazo definidas anteriormente (LR1 a 5) (preferentemente en una o más de LR1, LR2 o LR5, más
- 25 preferentemente en la LR5).

En una realización, la aciltransferasa variante para uso en los métodos y usos de la presente invención puede comprender una o más modificaciones de aminoácido, que no solo están definidas en uno o más de los conjuntos 2, 4, 6 y 7, sino que también en una o más de las IVR 1-6 (preferentemente dentro de las IVR 3, 5 o 6, más preferentemente dentro de la IVR 5 o la IVR 6) o dentro de una o más de las LR 1 a 5 (preferentemente dentro de

las LR1, LR2 o LR5, más preferentemente dentro de LR5).

Convenientemente, la variante de aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención puede comprender una o más modificaciones de aminoácido que no solo están en el conjunto 1 o en el conjunto 2, sino que también en la IVR3.

- 5 Convenientemente, la variante de aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención puede comprender una o más modificaciones de aminoácido que no solo están en el conjunto 1 o en el conjunto 2, sino que también en la IVR5.

- 10 Convenientemente, la variante de aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención puede comprender una o más modificaciones de aminoácido que no solo están en el conjunto 1 o en el conjunto 2, sino que también en la IVR6.

Convenientemente, la variante de aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención puede comprender una o más modificaciones de aminoácido que no solo están en el conjunto 1 o en el conjunto 2, sino que también en la LR1.

- 15 Convenientemente, la variante de aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención puede comprender una o más modificaciones de aminoácido que no solo están en el conjunto 1 o en el conjunto 2, sino que también en la LR2.

- 20 Igualmente, en algunas realizaciones de la presente invención, la enzima variante aciltransferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención no solo comprende la modificación de un aminoácido de uno o más residuos aminoacídicos que residen dentro de una esfera de 10 Å, preferentemente de 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3 Å, con centro en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47), sino que también comprende al menos una modificación de aminoácido en una o más de las regiones intermedias definidas más arriba (IVR1 a 6) (preferentemente en una o más de las IVR 3, 5 o 6, más preferentemente en la IVR 5 o en la IVR 6) y/o una o más de las regiones en lazo definidas más arriba (LR1 a 5) (preferentemente en una o más de LR1, LR2 o LR5, más preferentemente en LR5).

- 25 En una realización, la modificación de aminoácido es preferentemente en uno o más restos aminoacídicos que residen dentro de una esfera de 10 Å y también dentro de LR5.

Por esta razón, la cartografía por homología estructural puede comprender una o más de las etapas siguientes:

- i) alinear una secuencia madre con un modelo estructural (1IVN.PDB) mostrado en la figura 46;
- 30 ii) seleccionar uno o más restos aminoacídicos dentro de una esfera de 10 Å con centro en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47) (tal como uno o más restos aminoacídicos definidos en el conjunto 1 o en el conjunto 2); y/o seleccionar uno o más restos aminoacídicos dentro de IVR1 a 6 (preferentemente dentro de IVR 3, 5 o 6, más preferentemente dentro de IVR 5 o de IVR 6); y/o seleccionar uno o más restos aminoacídicos dentro de LR1 a 5 (preferentemente dentro de LR1, LR2 o LR5, más preferentemente dentro de LR5); y
- 35 iii) modificar uno o más aminoácidos seleccionados de acuerdo con la etapa (ii) en dicha secuencia madre.

En una realización, el resto aminoacídico seleccionado puede residir dentro de una esfera de 9 Å, preferentemente dentro de una esfera de 8, 7, 6, 5, 4 o 3 Å, con centro en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47).

Convenientemente, la cartografía por homología estructural puede comprender una o más de las etapas siguientes:

- 40 i) alinear una secuencia madre con un modelo estructural (1IVN.PDB) mostrado en la figura 46;
- 45 ii) seleccionar uno o más aminoácidos dentro de una esfera de 10 Å con centro en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47) (tal como uno o más de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 1 o en el conjunto 2); y/o seleccionar uno o más restos aminoacídicos dentro de IVR1 a 6 (preferentemente dentro de IVR 3, 5 o 6, más preferentemente dentro de IVR 5 o IVR 6); y/o seleccionar uno o más restos aminoacídicos dentro de LR1 a 5 (preferentemente dentro de LR1, LR2 o LR5, más preferentemente dentro de LR5):
- iii) determinar es uno o más restos aminoacídicos seleccionados de acuerdo con la etapa (ii) están altamente conservados (en particular si son restos del centro activo y/o parte del motivo GDSx y/o parte del motivo GANDY): y
- 50 modificar uno o más aminoácidos seleccionados de acuerdo con la etapa (ii), excluyendo las regiones conservadas identificadas de acuerdo con la etapa (iii) en dicha secuencia madre.

Convenientemente, los uno o más aminoácidos seleccionados en los métodos detallados más arriba no están solo en la esfera de 10 Å con centro en el átomo de carbono central de la molécula de glicerol en el centro activo (véase la figura 47) (tal como uno o más de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 1 o en el conjunto 2), sino que también se encuentran dentro de una o más de las IVR 1 a 6 (preferentemente dentro de las IVR 3, 5 o 6, más preferentemente dentro de la IVR 5 o de la IVR 6) o dentro de una o más de las LR 1 a 5 (preferentemente dentro de LR1 o LR2 o LR 5, más preferentemente dentro de LR5).

En una realización, las modificaciones de uno o más aminoácidos están preferentemente en LR5. Cuando es el caso de que la modificación o modificaciones están dentro de LR5, la modificación no es una que se defina en el conjunto 5. Convenientemente, las modificaciones de uno o más aminoácidos no solo caen dentro de la región definida por LR5, sino que también constituyen un aminoácido dentro de uno o más de conjunto 2, conjunto 4, conjunto 6 o conjunto 7.

Convenientemente, el alineamiento por homología de secuencia puede comprender una o más de las etapas siguientes:

- i) seleccionar una primera lípido aciltransferasa madre;
- 15 ii) identificar una segunda lípido aciltransferasa relacionada que tenga una actividad deseable;
- iii) alinear dicha primera lípido aciltransferasa madre y la segunda lípido aciltransferasa relacionada;
- iv) identificar los residuos aminoacídicos que difieren entre las dos secuencias; y
- v) modificar uno o más de los restos aminoacídicos identificados de acuerdo con la etapa (iv) en dicha lípido aciltransferasa madre.

20 Convenientemente, el alineamiento por homología de secuencia puede comprender una o más de las etapas siguientes:

- i) seleccionar una primera lípido aciltransferasa madre;
- ii) identificar una segunda lípido aciltransferasa relacionada que tenga una actividad deseable;
- iii) alinear dicha primera lípido aciltransferasa madre y la segunda lípido aciltransferasa relacionada;
- 25 iv) identificar los restos aminoacídicos que difieren entre las dos secuencias;
- v) determinar si uno o más restos aminoacídicos seleccionados de acuerdo con la etapa (iv) están altamente conservados (en particular si son restos del centro activo y/o parte del motivo GDSx y/o parte del motivo GANDY); y
- 30 vi) modificar uno o más de los restos aminoacídicos identificados de acuerdo con la etapa (iv) excluyendo las regiones conservadas identificadas de acuerdo con la etapa (v) en dicha secuencia madre.

Convenientemente, dicha primera lípido aciltransferasa madre puede comprender una cualquiera de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 19, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 25, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 27, SEQ ID n.º 28, SEQ ID n.º 29, SEQ ID n.º 30, 35 SEQ ID n.º 32 o SEQ ID n.º 33.

Convenientemente, dicha segunda lípido aciltransferasa relacionada puede comprender una cualquiera de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 19, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 25, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 27, SEQ ID n.º 28, SEQ ID n.º 29, SEQ ID n.º 30, SEQ ID n.º 32 o SEQ ID n.º 33.

La enzima variante debe comprender al menos una modificación de aminoácido en comparación con la enzima madre. En algunas realizaciones, la enzima variante puede comprender al menos 2, preferentemente al menos 3, preferentemente al menos 4, preferentemente al menos 5, preferentemente al menos 6, preferentemente al menos 7, preferentemente al menos 8, preferentemente al menos 9, preferentemente al menos 10, modificaciones de 45 aminoácido en comparación con la enzima madre.

Cuando se hace referencia a los restos aminoacídicos en la presente memoria, la numeración es la que se obtiene del alineamiento de la secuencia variante con la secuencia de referencia presentada como SEQ ID n.º 34 o SEQ ID n.º 35.

En un aspecto, la enzima variante comprende preferentemente una o más de las sustituciones de aminoácido 50 siguientes:

- S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o
 L17A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 S18A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, o Y; y/o
 K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 5 M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Y30A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
 G40A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 10 K82A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 W111A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; y/o
 V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
 15 A114C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Y117A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
 L118A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 P156A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 20 G159A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Q160A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N161A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 P162A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 S163A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o
 25 A164C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 R165A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, o Y; y/o
 S166A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o
 Q167A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 K168A C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 30 V169A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
 V170A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
 E171A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 A172C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
 35 H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N181A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

Q182A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y, preferentemente K; y/o

M209A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

5 N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

Y226A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o

Y230A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W; y/o

K284A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

M285A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

10 Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o

V290A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o

E309A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o

S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y.

Además, o alternativamente a ello, debe haber una o más extensiones carboxiterminales. Preferentemente, la extensión carboxiterminal adicional está comprendida por uno o más aminoácidos alifáticos, preferentemente un aminoácido apolar, más preferentemente de I, L, V o G. Por esta razón, la presente invención da a conocer además una enzima variante que comprende una o más de las extensiones carboxiterminales siguientes: 318I, 318L, 318V, 318G.

20 Cuando ocurre que los restos en el esqueleto madre difieren de los de P10480 (SEQ ID n.º 2), tal y como se determina mediante alineamiento por homología y/o alineamiento estructural con P10480 y/o 1IVN, podría ser deseable reemplazar los restos que se alinean con uno o más de los restos aminoácidos siguientes en P10480 (SEQ ID n.º 2): Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, 25 Met285, Gln289, Val290, Glu309 o Ser310, con el resto encontrado en P10480, respectivamente.

Las enzimas variantes que tienen menos actividad hidrolítica frente a un fosfolípido, tal como fosfatidilcolina (PC), también podrían tener más actividad transferasa desde un fosfolípido.

Las enzimas variantes que tienen más actividad transferasa desde un fosfolípido, tal como fosfatidilcolina (PC), también podrían tener más actividad hidrolítica frente a un fosfolípido.

30 Convenientemente, uno o más de los siguientes sitios puede intervenir en la fijación del sustrato: Leu17; Ala114; Tyr179; His180; Asn181; Met209; Leu210; Arg211; Asn215; Lys284; Met285; Gln289; Val290.

1. La modificación de uno o más de los siguientes restos podría dar lugar a una enzima variante con más actividad transferasa absoluta frente a fosfolípido:

S3, D157, S310, E309, Y179, N215, K22, Q289, M23, H180, M209, L210, R211, P81, V112, N80, L82, N88; N87

35 Las modificaciones específicas que podrían proporcionar una enzima variante en la que se haya mejorado la actividad transferasa desde un fosfolípido se podrían seleccionar entre una o más de las siguientes:

S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y; preferentemente N, E, K, R, A, P o M, lo más preferentemente S3A

D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente D157S, R, E, N, G, T, V, Q, K o C

40 S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y; preferentemente S310T -318E

E309A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W o Y; preferentemente E309R, E, L, R o A

Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W; preferentemente Y179D, T, E, R, N, V, K, Q o S, más preferentemente E, R, N, V, K o Q

N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N215 S, L, R o Y

K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente K22E, R, C o A

Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y; preferentemente Q289R, E, G, P o N

M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente M23K, Q, L, G, T o S

H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente H180 Q, R o K

5 M209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente M209Q, S, R, A, N, Y, E, V o L

L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente L210R, A, V, S, T, I, W o M

R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W o Y; preferentemente R211T

P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente P81G

V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W o Y; preferentemente V112C

10 N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N80R, G, N, D, P, T, E, V, A o G

L82A, C, D, E, F, G, H, I, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente L82N, S o E

N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N88C

N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferentemente N87M o G

15 La modificación de uno o más de los siguientes restos da lugar a una enzima variante que tiene una mayor actividad transferasa absoluta frente a fosfolípido:

S3 N, R, A, G

M23 K, Q, L, G, T, S

H180 R

L82 G

20 Y179 E, R, N, V, K o Q

E309 R, S, L o A

Una modificación preferente es N80D. Este es el caso en particular cuando se usa la secuencia de referencia SEQ ID n.º 35. Por lo tanto, en una realización preferente de la presente invención, la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención comprende la SEQ ID n.º 35.

25 Tal y como se ha observado más arriba, cuando se hace referencia a restos aminoacídicos específicos en la presente memoria, la numeración es la que se obtiene del alineamiento de la secuencia variante con la secuencia de referencia presentada como SEQ ID n.º 34 o SEQ ID n.º 35.

30 Con mucha más preferencia, la lípido aciltransferasa para uso en el método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16 (figura 10), o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más, preferentemente del 85% o más, más preferentemente del 90% o más, incluso más preferentemente del 95% o más, incluso más preferentemente del 98% o más, incluso más preferentemente del 99% o más, con la SEQ ID n.º 16. Esta enzima se puede considerar una enzima variante.

35 Para evitar que surjan dudas, cuando se explica un determinado aminoácido en un sitio específico, por ejemplo L118, esto se refiere al aminoácido específico en el resto número 118 en la SEQ ID n.º 34 a menos que se indique otra cosa. Sin embargo, el resto de aminoácido de la posición 118 en una enzima madre diferente puede no ser leucina.

40 Por esta razón, cuando se explica la sustitución de un aminoácido en el resto 118, aunque se puede hacer referencia a L118, el experto en la técnica debe entender rápidamente que cuando la enzima madre es diferente a la mostrada en la SEQ ID n.º 34, el aminoácido a sustituir puede no ser leucina. Por lo tanto, es posible que, cuando se sustituya una secuencia de aminoácidos en una enzima original que no es la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 34, el nuevo (sustituyente) aminoácido puede ser el mismo que se explica en la SEQ ID n.º 34. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando el aminoácido en dicho resto 118 no es leucina y es, por tanto, diferente del aminoácido en el resto 118 en la SEQ ID n.º 34. En otras palabras, en el resto 118, por ejemplo, si la enzima madre tiene en esta posición un aminoácido que no es leucina, este aminoácido se puede sustituir por leucina de acuerdo con la presente invención.

Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad se basa en el número de elementos de la secuencia que son iguales. El grado de identidad de acuerdo con la presente invención se puede determinar adecuadamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica, tal como GAP proporcionado por el paquete de programas del GCG (Manual del programa de paquete de Wisconsin, versión 8, agosto de 1994, 5 Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, US53711) (Needleman y Wunsch [1970], *J of Molecular Biology* 48, 443-445) usando los siguientes ajustes para la comparación de secuencias polipeptídicas: penalización por crear un hueco, 3,0, y penalización por extensión del hueco, 0,1. Convenientemente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos se determina sobre al menos 20 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 30 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 40 aminoácidos 10 contiguos, preferentemente sobre al menos 50 aminoácidos contiguos, preferentemente sobre al menos 60 aminoácidos contiguos.

Convenientemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso de acuerdo con la presente invención se puede obtener, preferentemente se obtiene, de organismos de uno o más de los siguientes géneros: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, 15 *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* y *Corynebacterium*.

Convenientemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso de acuerdo con la presente invención se puede obtener, preferentemente se obtiene, de uno o más de lo siguientes organismos:

Aeromonas hydrophila, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Mycobacterium*, 20 *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis* *Lactobacillus helveticus*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Bacillus sp*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis* *Thermobifida fusca* y *Corynebacterium efficiens*. 25

En un aspecto, preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa para uso de acuerdo con la presente invención se puede obtener, preferentemente se obtiene, de uno o más de *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida*.

En una realización, convenientemente, el esteroles y/o el estanol pueden comprender una o más de los rasgos estructurales siguientes:

- 30 i) un grupo 3-β-hidroxilo o un grupo 3-α-hidroxilo; y/o
- ii) anillos A:B en la posición cis o anillos A:B en la posición trans o C5-C6 es insaturado.

Los esteroides aceptores de acilo adecuados incluyen colesterol y fitoesteroides, por ejemplo α-sitosterol, β-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, campesterol, 5,6-dihidrosterol, brassicasterol, α-espinaesterol, β-espinaesterol, γ-espinaesterol, δ-espinaesterol, fucosterol, dimosterol, ascosterol, serebisterol, episterol, anasterol, hyposterol, 35 condriasterol, desmosterol, calinosterol, poriferasterol, clionasterol, glucósidos de esteroles, tocoferol, tocotrienol y otros derivados o formas isoméricas sintéticos o naturales.

Ventajosamente, en una realización, el esteroles aceptor de acilo es el tocoferol. Convenientemente, el tocoferol puede ser uno o más de γ-, δ-, β- o d-α-tocoferol, que incluye el succinato de d-α-tocoferol, por ejemplo. En una realización, preferentemente el esteroles aceptor de acilo es el α-tocoferol.

40 En una realización, preferentemente, el método de acuerdo con la presente invención incluye la etapa de añadir tocoferol, preferentemente α-tocoferol, al aceite.

En un aspecto, el esteroles aceptor de acilo es preferentemente el colesterol.

En un aspecto, el esteroles y/o estanol aceptor de acilo es preferentemente un esteroles y/o estanol diferente al colesterol.

45 En un aspecto de la presente invención, convenientemente, puede actuar como el aceptor de acilo más de un esteroles y/o estanol, convenientemente pueden actuar como el aceptor de acilo más de dos esteroides y/o estanoles. En otras palabras, en un aspecto de la presente invención, convenientemente se puede producir más de un éster de esteroles y/o éster de estanol. Convenientemente, cuando el colesterol es el aceptor de acilo, también puede actuar como aceptor de acilo uno o más esteroides adicionales o uno o más estanoles. Por esta razón, en un aspecto, la presente invención da a conocer un método para la producción *in situ* tanto de un éster de tocoferol como al menos 50 de otro éster de esteroles o de estanol en combinación. En otras palabras, la lípido aciltransferasa para algunos aspectos de la presente invención puede transferir un grupo acilo desde un lípido hasta tanto tocoferol como al menos un esteroles adicional y/o al menos un estanol.

En algunos aspectos, el aceite preparado de acuerdo con la presente invención se podría utilizar para reducir el

riesgo de enfermedades cardiovasculares.

En un aspecto, el aceite preparado de acuerdo con la presente invención se puede usar para reducir el colesterol en el suero sanguíneo y/o reducir la lipoproteína de baja densidad. Tanto el colesterol en el suero sanguíneo como las lipoproteínas de baja densidad se han asociado con determinadas enfermedades en los humanos, tales como

5 aterosclerosis y/o cardiopatías, por ejemplo. Por esta razón, se contempla que los aceites preparados de acuerdo con la presente invención se puedan utilizar para reducir el riesgo de tales enfermedades.

En otro aspecto de la presente invención se da a conocer el uso de un aceite comestible de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Por esta razón, en un aspecto de la presente invención se da a conocer el uso de un aceite comestible de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento y/o prevención de aterosclerosis y/o cardiopatías.

10

En un aspecto más, la presente invención da a conocer un medicamento que comprende un aceite comestible de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto más, la presente invención da a conocer un método para tratar y/o prevenir una enfermedad en un paciente humano o animal, comprendiendo dicho método la administración al paciente de una cantidad eficaz de un

15 aceite comestible de acuerdo con la presente invención.

Convenientemente, el esteroles aceptor de acilo puede ser uno que se encuentre de forma natural en los aceites comestibles o vegetales.

Alternativamente, o además, el esteroles aceptor de acilo puede ser uno que se añade al aceite comestible o vegetal.

Cuando se da el caso de que un esteroles y/o un estanol se añade a un aceite comestible, el esteroles y/o estanol se puede añadir antes, a la vez, o después, de añadir la lipido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención. Convenientemente, la presente invención puede abarcar la adición de estanoles/esteroles exógenos, en particular fitoesteroles/fitoestanoles, a un aceite comestible o vegetal antes de añadir, o a la vez que se añade, la enzima de acuerdo con la presente invención.

20

Para algunos aspectos, uno o más esteroles presentes en el aceite comestible se pueden convertir en uno o más estanoles antes de añadir, o a la vez que se añade, la lipido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención. Se puede emplear cualquier método adecuado para convertir esteroles en estanoles. Por ejemplo, la conversión se puede llevar a cabo mediante hidrogenación química, por ejemplo. La conversión se puede realizar antes de añadir la lipido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención, o a la vez que se añade la lipido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención. Las enzimas adecuadas para la conversión de esteroles en estanoles se explican en el documento WO00/061771.

25

30

Convenientemente, la presente invención se puede utilizar para producir ésteres de fitoestanol *in situ* en un aceite comestible. Los ésteres de fitoestanol son más solubles en las membranas lipídicas, más biodisponibles y tienen mejores beneficios sobre la salud (véase, por ejemplo, el documento WO92/99640).

Una ventaja de la presente invención es que los ésteres de esteroles y/o estanol se producen en el aceite comestible durante el desgomado del mismo. Una ventaja adicional es que la enzima desgoma sin aumentar, o sin aumentar sustancialmente, el contenido de ácidos grasos libres en el aceite comestible. La producción de ácidos grasos libres puede ser perjudicial para el aceite comestible. Preferentemente, el método de acuerdo con la presente invención da lugar al desgomado de un aceite comestible en el que la acumulación de ácidos grasos libres está reducida y/o eliminada. Sin querer atarse a ninguna teoría, de acuerdo con la presente intención, el ácido graso que se elimina del lipido se transfiere mediante la lipido aciltransferasa a un aceptor de acilo, por ejemplo un esteroles y/o un estanol. Por esta razón, la cantidad global de ácidos grasos en los productos alimenticios para consumo humano no aumentan, o aumentan solo una cantidad insignificante. Esto está en una clara contraposición con la situación en la que las fosfolipasas, tales como la Lecitase Ultra, se utilizan en el desgomado enzimático de los aceites comestibles. En particular, el uso de tales fosfolipasas puede ocasionar un aumento de la cantidad de ácidos grasos libres en el

35

40

45

aceite comestible, lo que puede ser perjudicial. De acuerdo con la presente invención, la acumulación de ácidos grasos libres se reduce y/o elimina cuando se compara la cantidad de ácidos grasos libres que se habrían acumulado cuando se haya utilizado una enzima fosfolipasa A, tal como la Lecitase UltraTM, en lugar de la lipido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención.

Una lipido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención puede resultar adecuada para usar en el desgomado enzimático de los aceites vegetales o comestibles. Al procesar aceites vegetales o comestibles, el aceite vegetal o comestible se trata con una lipido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención de manera que se hidrolice la mayor parte del fosfolípido. Preferentemente, los grupos acilo (ácidos grasos) se transfieren desde los lípidos polares a un aceptor de acilo. El proceso de desgomado da lugar típicamente a la reducción del contenido de los lípidos polares, en particular de los fosfolípidos, en un aceite comestible debido a la hidrólisis de la mayor parte (esto es, más del 50%) del fosfolípido. Típicamente, la fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado se separa del aceite. Convenientemente, el aceite comestible o vegetal puede tener inicialmente (tratamiento previo con la

50

55

enzima de acuerdo con la presente invención) un contenido de fósforo de 50 a 250 ppm.

Como será consciente el experto en la técnica, la terminología «desgomado» tal y como se usa en la presente memoria significa el refinado de aceite mediante la conversión de los fosfátidos (tales como lecitina, fosfolípidos y aceite ocluido) en fosfátidos hidratables. El aceite que se ha desgomado es más fluido y por esta razón se maneja mejor que el aceite que no se ha desgomado.

La terminología «transferasa» tal y como se usa en la presente memoria es intercambiable con la terminología «lípidos aciltransferasa».

Convenientemente, la lípidos aciltransferasa tal y como se define en la presente memoria cataliza una o más de las reacciones siguientes: interesterificación, transesterificación, alcoholólisis, hidrólisis.

10 La terminología «interesterificación» se refiere a la transferencia catalizada enzimáticamente de grupos acilo entre un lípidos dador y un lípidos aceptor, en donde el lípidos dador no es un grupo acilo libre.

La terminología «transesterificación» tal y como se utiliza en la presente invención significa la transferencia catalizada enzimáticamente de un grupo acilo desde un lípidos dador (que no sea un ácido graso libre) a un aceptor de acilo (que no sea agua).

15 Tal y como se usa en la presente invención, la terminología «alcoholólisis» se refiere a la escisión enzimática de un enlace covalente de un derivado ácido mediante reacción con un alcohol ROH de tal forma que los productos se combinan con el H del alcohol y el otro producto se combina con el grupo OR del alcohol.

Tal y como se usa en la presente invención, la terminología «alcohol» se refiere a un compuesto alquilo que contiene un grupo hidroxilo.

20 Tal y como se usa en la presente invención, la terminología «hidrólisis» se refiere a la transferencia catalizada enzimáticamente de un grupo acilo desde un lípidos al grupo OH de una molécula de agua.

La terminología «sin aumentar o sin aumento sustancial de los ácidos grasos libres» tal y como se utiliza en la presente memoria significa que, preferentemente, la lípidos aciltransferasa de acuerdo con la presente invención tiene una actividad transferasa del 100% (esto es, transfiere el 100% de los grupos acilo desde un dador de acilo al aceptor de acilo, sin ninguna actividad hidrolítica); sin embargo, la enzima podría transferir al aceptor de acilo menos del 100% de los grupos acilo presentes en el dador de acilo lipídico. En tal caso, la actividad aciltransferasa da cuenta de preferentemente al menos el 5%, más preferentemente al menos el 10%, más preferentemente al menos el 20%, más preferentemente al menos el 30%, más preferentemente al menos el 40%, más preferentemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 60%, más preferentemente al menos el 70%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 90% y más preferentemente al menos el 98%, de la actividad enzimática total. El porcentaje de actividad transferasa (esto es, la actividad transferasa como porcentaje de la actividad enzimática total) se puede determinar mediante el siguiente protocolo:

La enzima adecuada para uso en los métodos de la invención tiene preferentemente actividad fosfolipasa en un ensayo de actividad fosfolipasa estándar que se explica a continuación.

35 **Determinación de la actividad fosfolipasa (ensayo de actividad fosfolipasa [PLU-7]):**

Sustrato:

Se dispersaron L- α -fosfatidilcolina 95% vegetal al 0,6% (Avanti #441601), Triton-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl₂ a 5 mM en tampón HEPES a 0,05 M, pH 7.

Procedimiento del ensayo:

40 Se añadieron 400 μ l del sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó en un Thermomixer de Eppendorf a 37 °C durante 5 min. A tiempo t = 0 se añadieron 50 μ l de la solución de enzima. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló 10 x 100 rpm en un Thermomixer de Eppendorf a 37 °C durante 10 min. A tiempo t = 10 se colocó el tubo Eppendorf en otro Thermomixer a 99 °C durante 10 min para parar la reacción.

45 Los ácidos grasos libres de las muestras se analizaron con el kit NEFA C de WAKO GmbH.

La actividad enzimática PLU-7 a pH 7 se calculó como micromoles de ácidos grasos producidos por minuto en las condiciones del ensayo.

Más preferentemente, la lípidos aciltransferasa también tendrá actividad transferasa tal y como se define con el protocolo que viene a continuación:

50 **Protocolo para la determinación del porcentaje de actividad aciltransferasa:**

Un aceite comestible al cual se le ha añadido una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención se puede extraer siguiendo la reacción enzimática con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 y la fase orgánica que contiene el material lípido se aísla y analiza por cromatografía gas-líquido (GLC) y HPLC de acuerdo con el procedimiento detallado más adelante. De los análisis de HPLC y GLC se puede determinar la cantidad de ácidos grasos libres y uno o más ésteres de esteroles/estanol. De la misma manera se analizó un control de aceite comestible al cual no se le había añadido la enzima de acuerdo con la presente invención.

Cálculo:

De los resultados de los análisis de GLC y de HPLC se puede calcular el incremento de ácidos grasos libres y de ésteres de esteroles/estanol:

10 $\Delta\%$ ácido graso = % ácido graso (enzima) – % ácido graso (control); Mv ácido graso = masa molecular media de los ácidos grasos;

$A = \Delta\%$ éster de esteroles/Mv éster de esteroles (donde $\Delta\%$ éster de esteroles = % éster de esteroles/estanol(enzima) – % éster de esteroles/estanol(control) y Mv éster de esteroles = masa molecular media de los ésteres de esteroles/estanol);

La actividad transferasa se calcula como un porcentaje de la actividad enzimática total:

$$15 \quad \% \text{ actividad transferasa} = \frac{A * 100}{A + \Delta\% \text{ ácido graso} / (\text{Mv ácido graso})}$$

Si aumentan los ácidos grasos en el aceite comestible, no aumentan preferentemente de forma sustancial, esto es, en una cantidad significativa. Mediante esto se quiere decir que el aumento de ácidos grasos libres no afecta negativamente a la calidad del aceite comestible.

20 El aceite comestible utilizado para el ensayo de actividad aciltransferasa es preferentemente aceite de soja complementado con esteroles vegetal (1%) y aceite de fosfatidilcolina (2%) usando el método del ejemplo 3. Para el ensayo se utilizó una dosis de enzima preferentemente de 0,2 PLU-7/g de aceite, más preferentemente 0,08 PLU-7/g de aceite. La cantidad de fosfolípido presente en el aceite y/o el porcentaje de conversión de esteroles se determinó preferentemente después de 4 horas, más preferentemente después de 20 horas.

25 En algunos aspectos de la presente invención, la terminología «sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres» tal y como se utiliza en la presente invención significa que la cantidad de ácidos grasos libres en un aceite comestible tratado con una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención está por debajo de la cantidad de ácidos grasos libres producidos en el aceite comestible cuando se ha utilizado una enzima diferente a la lípido aciltransferasa de la presente invención, tal como por ejemplo, cuando se compara con la cantidad de ácidos grasos libres producidos cuando se utiliza una enzima fosfolípasa convencional, por ejemplo Lecitase Ultra™ (Novozymes A/S, Dinamarca).

Además de ello, o en su lugar, la valoración del % de actividad transferasa en un aceite (más arriba), para identificar las enzimas lípido aciltransferasas más preferentes para uso en los métodos de la invención, se puede utilizar el ensayo titulado «Protocolo para identificar lípido aciltransferasas para uso en la presente invención» que viene a continuación.

35 Protocolo para identificar lípido aciltransferasas

Una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención es aquella que da lugar a:

i) la eliminación de fosfolípidos presentes en un aceite de soja complementado con esteroles vegetal (1%) y aceite de fosfatidilcolina (2%) mediante el método explicado en el ejemplo 3.

y/o

40 ii) la conversión (% de conversión) a éster de esteroles del esteroles añadido cuando se usa el método explicado en el ejemplo 3. Se puede utilizar el método de GLC que se explica en el ejemplo 5 para determinar la cantidad de esteroles y ésteres de esteroles.

Para el ensayo, la dosis de enzima utilizada puede ser de 0,2 PLU-7/g de aceite, preferentemente 0,08 PLU-7/g de aceite. La cantidad de fosfolípidos presente en el aceite y/o en la conversión (% de la conversión) de esteroides se determina preferentemente después de 4 horas, más preferentemente después de 20 horas.

En el protocolo para identificar las lípido aciltransferasas, después del tratamiento enzimático, se añade preferentemente un 5% de agua y se mezcla a fondo con el aceite. A continuación se separa el aceite de la fase acuosa mediante centrifugación (véase «Enzyme-catalyzed degumming of vegetable oils» de Buchold, H. y Laurgi A.-G., *Fett Wissenschaft Technologie* (1993), 95(8), 300-4, ISSN: 0931-5985), y se puede entonces analizar el contenido de fósforo de la fase del aceite mediante el siguiente protocolo («Ensayo del contenido de fósforo»):

Ensayo del contenido de fósforo

La cantidad de fosfolípidos presentes en un aceite después del desgomado se determina primero preparando la muestra de aceite de acuerdo con la preparación de la muestra explicada en el Método Oficial de la AOAC 999.10 (>espectrofotometría de absorción atómica de los alimentos para plomo, cadmio, cinc, cobre e hierro después de digestión por microondas, primera acción 1999 del Método AOAC-NMKL). La cantidad de fosfolípidos en el aceite se mide así mediante el análisis del contenido de fósforo en la muestra de aceite después del desgomado de acuerdo con el Método Oficial de la AOAC 985.01 (>Método espectroscópico en plasma acoplado inductivamente para metales y otros elementos en plantas y alimentos para mascotas, primera acción 1985, última acción 1988).

La cantidad de fósforo presente en el aceite después del desgomado está preferentemente por debajo de 50 ppm, preferentemente por debajo de 40 ppm, preferentemente por debajo de 30 ppm, preferentemente por debajo de 20 ppm, preferentemente por debajo de 10 ppm, preferentemente por debajo de 5 ppm. El aceite tras el desgomado, tal y como se ilustra en los ejemplos, puede estar sustancialmente desprovisto de fosfolípidos, esto es, contener menos de 1 ppm de fosfolípidos.

El porcentaje de conversión del esteroles presente en el aceite es al menos del 1%, preferentemente al menos del 5%, preferentemente al menos del 10%, preferentemente al menos del 20%, preferentemente al menos del 30%, preferentemente al menos del 40%, preferentemente al menos del 50%, preferentemente al menos del 60%, preferentemente al menos del 70%, preferentemente al menos del 80%, preferentemente al menos del 90%, preferentemente al menos del 95%.

En una realización, el porcentaje de conversión del esteroles presente en el aceite es al menos del 5%, preferentemente al menos del 20%.

Desgomado con poca agua

Sorprendentemente, se ha encontrado que cuando una lipasa se utiliza en un procedimiento de desgomado enzimático de un aceite comestible, el desgomado enzimático se puede llevar a cabo en un medio con muy poca agua. Se sigue necesitando algo de agua, por ejemplo, cuando se añade la enzima al aceite la enzima se puede añadir en una cantidad pequeña de agua, tal como menos del 1%, preferentemente el 0,5%, más preferentemente menos del 0,2%, más preferentemente menos del 0,1%.

Preferentemente, el contenido de agua en el aceite comestible en los procesos y usos de acuerdo con la presente invención es de menos del 1%, preferentemente menos del 0,5%, más preferentemente menos del 0,2%, más preferentemente menos del 0,1%.

Por esta razón, una ventaja de la presente invención es que cuando solo se usa una pequeña cantidad de agua (a saber, <5%, preferentemente <1%, preferentemente <0,5%, preferentemente <0,2%) durante el desgomado enzimático, las gomas (esto es, la porción que contiene el fósforo) se separan del aceite, por ejemplo en forma de un precipitado sólido. El precipitado sólido se puede eliminar fácilmente del aceite desgomado mediante métodos tales como simple decantación del aceite o eliminando la goma por filtración, por ejemplo.

Esto contrasta enormemente con los procedimientos enzimáticos convencionales de desgomado, en los que se añade una cantidad significativa de agua al aceite. Esto se debe a que en los procedimientos enzimáticos convencionales de desgomado posteriores al desgomado en presencia de un alto contenido de agua, se produce una capa de agua que comprende la porción que contiene el fósforo (por ejemplo, la porción que comprende los lisofosfolípidos). Esta capa de agua se debe eliminar y se puede eliminar por centrifugación, por ejemplo. No obstante, la eliminación de la capa de agua es significativamente más difícil que la eliminación del precipitado sólido obtenido cuando se usa el procedimiento de la presente invención.

Por lo tanto, el procedimiento enzimático de desgomado de acuerdo con la presente invención se podría considerar como un «procedimiento de desgomado con poca agua».

En una realización de la presente invención, la goma se puede eliminar ajustando el agua al 5% en el aceite y luego centrifugando el aceite (véase «Enzyme-catalyzed degumming of vegetable oils» de Buchold, H. y Laurgi A.-G., *Fett Wissenschaft Technologie* (1993), 95(8), 300-4).

Por lo tanto, la invención da a conocer un procedimiento para el desgomado de un aceite comestible, tal como un aceite comestible crudo (por ejemplo, aceite de soja crudo), sin tener que lavar antes del desgomado ni tampoco eliminar el agua añadida durante el desgomado, que se necesitan cuando se utilizan fosfolipasas convencionales tales como la fosfolipasa pancreática y la Lecitase UltraTM.

Preferentemente, el aceite comestible tiene un contenido por debajo del 4,5% de agua, más preferentemente por debajo del 4%, por debajo del 3%, por debajo del 2%, por debajo de 1%, por debajo del 0,5%.

Convenientemente, el aceite comestible puede contener al menos un 0,1% de agua, tal como al menos un 0,3%, 0,4% o 0,5%.

Las lípido aciltransferasas preferentes para uso en la presente invención se identifican como las que tienen una alta actividad, tal como actividad hidrolítica de fosfolípidos elevada o actividad transferasa de fosfolípidos elevada sobre los fosfolípidos en un medio oleoso, más preferentemente las lípido aciltransferasas para uso en el desgomado enzimático tienen una actividad transferasa elevada de fosfolípido a esterol.

- 5 Tal y como se detalla más arriba, se pueden identificar otras aciltransferasas adecuadas para uso en los métodos de la invención mediante la identificación de la presencia de los bloques GDSx, GANDY y HPT tanto en el alineamiento con la secuencia consenso de Pfam00657 (SEQ ID n.º 1), y/o alineamiento con una aciltransferasa con GDSx, por ejemplo la SEQ ID n.º 28. Para valorar la idoneidad del desgomado, esto es, identificar las enzimas que tienen una actividad transferasa de al menos el 5%, más preferentemente de al menos el 10%, más preferentemente de al menos el 20%, más preferentemente de al menos el 30%, más preferentemente de al menos el 40%, más preferentemente de al menos el 50%, más preferentemente de al menos el 60%, más preferentemente de al menos el 70%, más preferentemente de al menos el 80%, más preferentemente de al menos el 90% y más preferentemente al menos el 98%, de la actividad enzimática total, tales aciltransferasas se analizan mediante el ensayo «Protocolo para la determinación del porcentaje de actividad aciltransferasa» detallado más arriba.
- 10
- 15 La presente invención se refiere al uso de una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención en el desgomado de aceites vegetales comestibles y/o de aceites comestibles, y los métodos para desgomar aceites comestibles o vegetales.

En un aspecto, la presente invención puede dar a conocer un método que comprende el uso de una lípido aciltransferasa para eliminar el contenido de fósforo no hidratable (NHP) en el aceite que comprende una cantidad relativamente alta de NHP.

20

La terminología «aceite comestible» tal y como se utiliza en la presente memoria puede englobar los aceites vegetales.

Preferentemente, el aceite comestible antes del tratamiento de acuerdo con la presente invención comprende un contenido de fósforo no hidratable de 50 a 250 ppm, preferentemente al menos de 60 ppm, preferentemente al menos de 100 ppm, e incluso más preferentemente al menos de 200 ppm, incluso más preferentemente por encima de 250 ppm.

25

Más preferentemente, el aceite comestible antes del tratamiento de acuerdo con la presente invención comprende un contenido de fósforo no hidratable en el margen 60 a 500 ppm, más preferentemente en el margen de 100 a 500 ppm, e incluso más preferentemente en el margen de 200 a 500 ppm.

30 Un aceite comestible tal y como se menciona en la presente memoria puede ser cualquier aceite que tiene una cantidad relativamente alta de fósforo no hidratable, pudiendo incluir aceite desgomado con agua, o más preferentemente se trata de un aceite crudo o semicrudo.

En un aspecto, el aceite comestible crudo tiene, antes de realizar el método de la invención, un contenido de fósforo por encima de 350 ppm, más preferentemente por encima de 400 ppm, incluso más preferentemente por encima de 500 ppm, y lo más preferentemente por encima de 600 ppm.

35

Los aceites englobados por el método de acuerdo con la presente invención pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, uno o más de aceite de soja, aceite de canola, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de palma, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de hueso de palma, aceite de colza y aceite de girasol.

40 Preferentemente, el aceite es uno o más de aceite de soja, aceite de girasol y aceite de colza (a veces denominado aceite de canola).

Más preferentemente, el aceite es uno o más de aceite de soja, aceite de girasol o aceite de colza.

Lo más preferentemente, el aceite es aceite de soja.

Estos aceites pueden estar en forma de un aceite crudo, un aceite semicrudo o un aceite de desgomado con agua.

45 Tal y como se utiliza en la presente invención, «aceite crudo» (también denominado en la presente memoria aceite sin desgomar) puede ser un aceite de extracción o de prensado o una mezcla de ambos a partir de, por ejemplo, colza, soja o girasol. El contenido de fosfátidos de un aceite crudo varía del 0,5% al 3% p/p, lo que se corresponde con un contenido de fósforo en el margen de 200 a 1200 ppm, más preferentemente en el margen de 250 a 1200 ppm. Además de los fosfátidos, el aceite crudo también contiene una pequeña concentración de glúcidos, sacáridos y complejos de metal y ácido fosfatídico con Ca, Mg e Fe.

50

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «aceite semicrudo» se refiere a cualquier aceite que no es un aceite crudo, pero que tiene un contenido de fosfátidos por encima de 250 ppm, más preferentemente por encima de 500 ppm. Tal aceite podría, por ejemplo, obtenerse al someter un aceite crudo a un procedimiento similar al

procedimiento de «desgomado con agua» descrito más adelante.

Tal y como se usa en la presente invención, el «aceite de desgomado con agua» se puede obtener típicamente mediante un «procedimiento de desgomado con agua» que comprende mezclar 1-3% p/p de agua caliente con aceite crudo caliente (60-90 °C). Los periodos de tratamiento habituales son de 30 a 60 minutos. La etapa de desgomado con agua elimina los fosfátidos y las gomas mucilaginosas que se han vuelto insolubles en el aceite cuando se hidrata. Los fosfátidos hidratados y las gomas se pueden separar del aceite por asentamiento, filtración o centrifugación, siendo la centrifugación la práctica más prevalente. El objetivo esencial de dicho procedimiento de desgomado con agua es el de separar los fosfátidos hidratados del aceite. La mezcla del agua caliente con el aceite, como está descrito más arriba, se debe entender en esta memoria de manera amplia como una mezcla de una solución acuosa con el aceite de acuerdo con los procedimientos estándares de desgomado con agua conocidos en la técnica.

Ventajosamente, el método y los usos de la presente invención permiten el desgomado de los aceites comestibles con medios con muy poca agua (<5%, preferentemente menos del 2%, más preferentemente menos del 1%). Por lo tanto, el desgomado se puede realizar con la adición de menos agua que cuando se utilizan enzimas convencionales. Una ventaja adicional de la presente invención es la producción de ésteres de esteroides (en particular, ésteres de tocoferol) en el aceite. Otra ventaja más de la presente invención es la eliminación (preferentemente la eliminación total) de los fosfolípidos. Una ventaja adicional de la presente invención es la eliminación (preferentemente la eliminación total) de los fosfolípidos sin eliminar el fitoesterol, y en particular el tocoferol. Se prefiere que, debido a la esterificación del fitoesterol, no haya una eliminación significativa de fitoesteroides, tales como el tocoferol, del aceite y en su lugar están simplemente esterificados. Sin embargo, en una realización, la cantidad de fitoesterol, tal como tocoferol, puede verse reducida. En tales realizaciones, la cantidad absoluta de fitoesterol, tal como tocoferol, puede verse reducida preferentemente en no más del 10%, alternativamente en no más del 25%, alternativamente en no más del 50%, alternativamente en no más del 75%. Una ventaja adicional más de la presente invención es la eliminación (preferentemente la eliminación total) de los fosfolípidos sin hidrolizar los triglicéridos.

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se explican ahora en los apartados apropiados según su título. Sin embargo, las explicaciones de cada apartado no se limitan necesariamente a cada apartado en particular.

DEFINICIÓN DE LOS CONJUNTOS

30 Conjunto de aminoácidos 1:

El conjunto de aminoácidos 1 es

Gly8, Asp9, Ser10, Leu11, Ser12, Tyr15, Gly44, Asp45, Thr46, Glu69, Leu70, Gly71, Gly72, Asn73, Asp74, Gly75, Leu76, Gln106, Ile107, Arg108, Leu109, Pro110, Tyr113, Phe121, Phe139, Phe140, Met141, Tyr145, Met151, Asp154, His157, Gly155, Ile156, Pro158.

35 Los motivos altamente conservados, tales como GDSx, y los restos catalíticos se quitaron de la selección del conjunto 1 (residuos subrayados). Para evitar dudas, el conjunto 1 define los restos aminoácidos dentro de los 10 Å del átomo de carbono central del glicerol en el centro activo del modelo 1IVN.

Conjunto de aminoácidos 2:

40 El conjunto de aminoácidos 2 (observe que la numeración de los aminoácidos se refiere a los aminoácidos de la secuencia de P10480 madura) es

Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289 y Val290.

comparación con la proteína que incluye la secuencia señal (SEQ ID n.º 28).

Las proteínas maduras de *Aeromonas salmonicida* GDSX (SEQ ID n.º 28) y *Aeromonas hydrophila* GDSX (SEQ ID n.º 26) difieren en cinco aminoácidos. Estos son Thr3Ser, Gln182Ala, Ser310Asn, Gly312-, donde el resto de *A. salmonicida* se recoge primero y el resto de *A. hydrophila* aparece después (figura 59). La proteína de *A. hydrophila* es de tan solo 317 aminoácidos de longitud y carece del resto en la posición 318. La *Aeromonas salmonicida* GDSX tiene una actividad considerablemente mayor sobre los lípidos polares, tales como sustratos galactolipídicos, que la proteína de *Aeromonas hydrophila*. Se realizó un barrido de sitio con las cinco posiciones de aminoácidos.

Conjunto de aminoácidos 4:

El conjunto de aminoácidos 4 es S3, Q182, E309, S310 y -318.

10 Conjunto de aminoácidos 5:

F13S, D15N, S18G, S18V, Y30F, D116N, D116E, D157N, Y226F, D228N Y230F.

Conjunto de aminoácidos 6:

El conjunto de aminoácidos 6 es Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn 87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318.

La numeración de los aminoácidos del conjunto 6 se refiere a los restos aminoacídicos en P10480 (SEQ ID n.º 2); los aminoácidos correspondientes en otros esqueletos de secuencia se pueden determinar por alineamiento por homología y/o alineamiento estructural con P10480 y/o 11VN.

20 Conjunto de aminoácidos 7:

El conjunto de aminoácidos 7 es Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn 87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318, Y30X (donde X se selecciona entre A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W), Y226X (donde X se selecciona entre A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W), Y230X (donde X se selecciona entre A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W), S18X (donde X se selecciona entre A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W), D157X (donde X se selecciona entre A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W).

La numeración de los aminoácidos del conjunto 7 se refiere a los restos aminoacídicos en P10480 (SEQ ID n.º 2); los aminoácidos correspondientes en otros esqueletos de secuencia se pueden determinar por alineamiento por homología y/o alineamiento estructural con P10480 y/o 11VN.

AISLADO

En un aspecto, el polipéptido o proteína para uso en la presente invención está preferentemente en una forma aislada. La terminología «aislado» significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la secuencia se asocia de forma natural en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza.

PURIFICADO

En un aspecto, preferentemente, el polipéptido o proteína para uso en la presente invención está en una forma purificada. La terminología «purificado» significa que la secuencia está en un estado relativamente puro, esto es, puro al menos al 51%, o al menos a aproximadamente el 75%, o al menos a aproximadamente el 80%, o puro al menos a aproximadamente el 90%, o puro al menos a aproximadamente el 95% o puro al menos a aproximadamente el 98%.

CLONACIÓN DE UNA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICA UN POLIPÉPTIDO DE ACUERDO CON LA PRESENTE INVENCION

Se puede purificar una secuencia de nucleótidos que codifica tanto un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria como un polipéptido que es adecuado para la modificación, a partir de cualquier célula u organismo que produzca dicho polipéptido. En la técnica se conocen diferentes métodos para aislar las secuencias de nucleótidos.

Por ejemplo, se puede construir una genoteca de ADNc o de ADN genómico con ARN mensajero o ADN cromosómico del organismo que produce el polipéptido. Si se conoce la secuencia de aminoácidos del polipéptido, se pueden sintetizar sondas oligonucleotídicas marcadas y usarlas para identificar los clones que codifican el

polipéptido a partir de la librería genómica preparada del organismo. Alternativamente, se podría utilizar una sonda oligonucleotídica marcada que contenga secuencias homólogas a otro gen de polipéptido conocido para identificar los clones que codifican el polipéptido. En el último caso, se utilizan condiciones de hibridación y de lavado poco rigurosas.

- 5 Alternativamente, se pueden identificar los clones que codifican el polipéptido mediante la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de bacterias que no contengan la enzima con la genoteca de ADN genómico resultante, y luego sembrar las bacterias transformadas en placas de agar con una enzima inhibida por el polipéptido, de manera que permite la identificación de los clones que expresan el polipéptido.
- 10 En otra alternativa más, se puede preparar sintéticamente la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido mediante los métodos estándares establecidos, por ejemplo el método de fosforamiditas descrito por Beucage S.L. et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22, p 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al. (1984) *EMBO J.* 3, p. 801-805. En el método de las fosforamiditas se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en los vectores apropiados.
- 15 La secuencia de nucleótidos puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc, o de origen mixto genómico y de ADNc, se puede preparar mediante la ligación de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según corresponda) de acuerdo con las técnicas estándares. Cada fragmento ligado corresponde a diferentes partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos, por ejemplo como los
- 20 descritos en el documento de patente de los Estados Unidos US 4 683 202 o en Saiki R K et al. (*Science* (1988) 239, pp. 487-491).

SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS

La presente invención también engloba el uso de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas que se definen en la presente memoria. La terminología «secuencia de nucleótidos» o

25 «secuencia nucleotídica» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia oligonucleotídica o a una secuencia polinucleotídica, y a variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tales como porciones de las mismas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser bicatenaria o monocatenaria según represente la cadena sentido o antisentido.

La terminología «secuencia de nucleótidos» o «secuencia nucleotídica» en relación con la presente invención

30 incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente, se refiere a ADN, más preferentemente al ADNc de la secuencia codificante.

En una realización preferente, la secuencia de nucleótidos que por sí misma codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria no cubre la secuencia de nucleótidos nativa en su medio natural cuando está unida a la secuencia o secuencias a las que se une de forma natural que están también

35 en su medio natural. Para facilitar la referencia, llamaremos a esta realización preferente la «secuencia de nucleótidos no nativa». Bajo este punto de vista, la terminología «secuencia de nucleótidos nativa» significa una secuencia de nucleótidos entera que está en su medio nativo y cuando está operativamente unida a un promotor entero con el que está asociada de forma natural, estando dicho promotor también en su medio nativo. Por esta razón, el polipéptido de la presente invención puede ser expresado por una secuencia de nucleótidos en su

40 organismo nativo, pero en donde la secuencia de nucleótidos no está bajo el control del promotor con el que se asocia de forma natural dentro del organismo.

Preferentemente, el polipéptido no es un polipéptido nativo. En este sentido, la terminología «polipéptido nativo» significa un polipéptido entero que está en su medio nativo y cuando se ha expresado a partir de su secuencia de nucleótidos nativa.

45 Típicamente, la secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos que tienen las propiedades específicas que se definen en la presente memoria se prepara con las técnicas de ADN recombinante (esto es, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos se podría sintetizar, entera o parcialmente, mediante métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers M. H. et al. (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 215-23 y Horn T et al. (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 225-232).

50 EVOLUCIÓN MOLECULAR

Una vez que se ha aislado una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, o que se ha identificado una secuencia de nucleótidos que codifica la posible enzima, puede ser deseable modificar la secuencia de nucleótidos seleccionada, por ejemplo puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una enzima de acuerdo con la presente invención.

55 Las mutaciones se pueden introducir con oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen las secuencias nucleotídicas que flanquean los sitios que se desean mutar.

Un método adecuado se describe en Morinaga et al. (*Biotechnology* (1984) 2, p. 646-649). Otro método para introducir mutaciones en las secuencias de nucleótidos que codifican una enzima se describe en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, p. 147-151).

5 En lugar de la mutagénesis específica de sitio, tal como la descrita más arriba, se pueden introducir mutaciones al azar, por ejemplo con un kit comercial, tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria por PCR Diversify de Clontech. La patente europea EP 0 583 265 se refiere a los métodos para optimizar la mutagénesis por PCR, que también se puede combinar con el uso de análogos mutagénicos de ADN, tales como los descritos en la patente europea EP 0 866 796. Las tecnologías de PCR propensa a error son adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con las características preferentes. El documento de patente internacional WO0206457 se refiere a la evolución molecular de lipasas.

15 Un tercer método para obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias de nucleótidos distintas, tanto con una serie de enzimas de restricción como con una enzima tal como la ADNasa I, y reensamblar secuencias nucleotídicas completas que codifiquen proteínas funcionales. Alternativamente, se puede usar una o más secuencias nucleotídicas distintas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia nucleotídica completa. Las tecnologías de barajado de ADN y de barajado de familias son idóneas para la producción de variantes de las lípido aciltransferasas con las características preferentes. Los métodos adecuados para realizar el 'barajado' se pueden encontrar en las patentes europeas EP 0 752 008, EP 1 138 763 y EP 103 606. El barajado también se puede combinar con otras formas de mutagénesis del ADN tal y como se describe en la patente de los Estados Unidos US 6 180 406 y la patente internacional WO 01/34835.

20 Por esta razón, en una secuencia de nucleótidos se pueden introducir numerosas mutaciones al azar o en sitios específicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, y posteriormente detectar selectivamente de distintas maneras los polipéptidos con una funcionalidad mejorada. Con el uso de métodos de recombinación *in silico* o exomediada (véase la patente internacional WO 00/58517 y las patentes de los Estados Unidos US 6 344 328 y US 6 361 974), por ejemplo, la evolución molecular se puede llevar a cabo donde la variante producida retiene poca homología con las enzimas o proteínas conocidas. Tales variantes obtenidas de esta forma podrían tener una analogía estructural significativa con las enzimas transferasa, pero tienen una homología de secuencia aminoacídica muy baja.

30 A modo de ejemplo no limitante, además, las mutaciones o las variantes naturales de una secuencia polinucleotídica se pueden recombinar tanto con el tipo silvestre como con otras mutaciones u variantes naturales para producir variantes nuevas. Tales variantes nuevas también se pueden detectar selectivamente por la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado.

35 La aplicación de los métodos de evolución molecular antes mencionados y similares permite identificar y seleccionar variantes de las enzimas de la presente invención que tengan las características preferentes sin ningún conocimiento previo de la estructura de la proteína ni de su función, y permite la producción de mutaciones o variantes impredecibles pero beneficiosas. Existen numerosos ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la técnica para optimizar o alterar la actividad enzimática, y tales ejemplos incluyen, sin limitarse a ellos, uno o más de los siguientes: optimización de la expresión y/o actividad en una célula huésped o *in vitro*, aumento de la actividad enzimática, alteración de la especificidad de sustrato y/o producto, aumento o disminución de la estabilidad enzimática o estructural, alteración de la actividad/especificidad de la enzima en las condiciones ambientales preferentes, por ejemplo, temperatura, pH y/o sustrato.

40 Como le resultará obvio a un experto en la técnica, con las herramientas de evolución molecular se puede alterar una enzima para mejorar su funcionalidad.

45 Convenientemente, la lípido aciltransferasa utilizada en la invención puede ser una variante, esto es, puede contener al menos una sustitución, delección o adición de aminoácido, cuando se compara con la enzima madre. Las enzimas variantes retienen una homología de al menos el 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, con la enzima madre. Las enzimas madre adecuadas podrían incluir cualquier enzima con actividad lipasa o esterasa. Preferentemente, la enzima madre se alinea con la secuencia consenso de Pfam00657.

50 En una realización preferente, una enzima variante de lípido aciltransferasa retiene o incorpora al menos uno o más de los restos aminoacídicos de la secuencia consenso de Pfam00657 encontrados en los bloques GDSx, GANDY y HPT.

Las enzimas, tales como las lipasas, con poca o ninguna actividad lípido aciltransferasa en un medio acuoso se pueden mutar con las herramientas de evolución molecular para introducir o reforzar la actividad transferasa, de manera que se produce una enzima lípido aciltransferasa con actividad transferasa significativa idónea para uso en las composiciones y métodos de la presente invención.

55 Convenientemente, la lípido aciltransferasa para uso en la invención puede ser una variante con actividad enzimática reforzada sobre los fosfolípidos cuando se compara con la enzima madre. Preferentemente, tales variantes también tienen una actividad baja o ausente sobre los lisolípidos polares. La actividad reforzada sobre los

fosfolípidos puede ser el resultado de la hidrólisis y/o la actividad transferasa o una combinación de ambas.

Las variantes de lípido aciltransferasa para uso en la invención pueden tener menos actividad sobre los triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos en comparación con la enzima madre.

5 Convenientemente, la enzima variante puede no presentar actividad sobre los triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos.

Alternativamente, la enzima variante para uso en la invención puede ser más activa sobre los triglicéridos y/o puede ser más activa también sobre uno o más de los siguientes: lípidos polares, fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina.

10 Se conocen variantes de lípido aciltransferasas, y una o más de tales variantes puede ser adecuada para uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención y/o en las composiciones enzimáticas de acuerdo con la presente invención. A modo de ejemplo sólo, las variantes de la lípido aciltransferasas que se describen en las siguientes referencias se pueden usar de acuerdo con la presente invención: Hilton y Buckley, *J Biol. Chem.* 1991 enero 15: 266 (2): 997-1000; Robertson et al. *J. Biol. Chem.* 1994 enero 21; 269(3):2146-50; Brumlik et al. *J. Bacteriol* 1996 abril; 178 (7): 2060-4; Peelman et al. *Protein Sci.* 1998 marzo; 7(3):587-99.

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

15 La presente invención también engloba el uso de secuencias de aminoácidos de los polipéptidos que tienen las propiedades específicas que se definen en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, la terminología «secuencia de aminoácidos» o «secuencia aminoacídica» es sinónima de la terminología «polipéptido» y/o la terminología «proteína». En algunos casos, la terminología «secuencia de aminoácidos» o «secuencia aminoacídica» es sinónima de la terminología «péptido».

20 La secuencia de aminoácidos se puede preparar/aislar de una fuente adecuada, o se puede fabricar sintéticamente o se puede preparar mediante el uso de las técnicas de ADN recombinante.

Convenientemente, las secuencias de aminoácidos se pueden obtener de los polipéptidos aislados explicados en la presente memoria mediante técnicas estándares.

Un método adecuado para determinar las secuencias aminoacídicas de los polipéptidos aislados es el siguiente:

25 El polipéptido purificado se puede liofilizar y 100 µg del material liofilizado se pueden disolver en 50 µl de una mezcla de urea a 8 M e hidrogenocarbonato de amonio a 0,4 M, pH 8,4. La proteína disuelta se puede desnaturalizar y reducir durante 15 min a 50 °C tras lo que se recubre con nitrógeno y se le añaden 5 µl de ditiotreitól a 45 mM. Después de enfriar a temperatura ambiente, se le pueden añadir 5 µl de yodoacetamida a 100 mM para modificar los restos de cisteína durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad con nitrógeno.

30 A la mezcla de reacción anterior se le pueden añadir 135 µl de agua y 5 µg de endoproteinasa Lys-C en 5 µl de agua, y la digestión se puede llevar a cabo a 37 °C en nitrógeno durante 24 h.

35 Los péptidos resultantes se pueden separar mediante HPLC de fase inversa en una columna VYDAC C18 (0,46 x 15 cm; 10 µm; The Separation Group, California, EE.UU.) con el solvente A (TFA al 0,1% en agua) y el solvente B (TFA al 0,1% en acetonitrilo). Los péptidos seleccionados se pueden volver a cromatografiar en una columna de Develosil C18 con el mismo sistema de solventes, antes de secuenciar el extremo amino. La secuenciación se puede realizar con un secuenciador 476A de Applied Biosystems con ciclos rápidos pulsantes de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, EE.UU.).

IDENTIDAD DE SECUENCIA U HOMOLOGÍA DE SECUENCIA

40 La presente invención también engloba el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia o de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o de una secuencia de nucleótidos que codifica tal polipéptido (a partir de ahora se denominará una «secuencia o secuencias homólogas»). En la presente memoria, la terminología «homólogo» significa una entidad que tiene un cierto grado de homología con las secuencias de aminoácidos en cuestión y las secuencias de nucleótidos en cuestión. En la presente memoria, la terminología «homología» equivale a
45 «identidad».

La secuencia de nucleótidos y/o secuencia de aminoácidos homóloga debe proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o refuerza la actividad de la enzima.

50 En este contexto, una secuencia homóloga se supone que incluye una secuencia de aminoácidos que puede tener una identidad de al menos el 75, 85 o 90%, preferentemente al menos el 95 o 98%, con la secuencia en cuestión. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos centros activos, etc. que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (esto es, restos aminoacídicos que tienen propiedades o funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar

la homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, una secuencia homóloga se supone que incluye una secuencia de nucleótidos que puede tener una identidad de al menos el 75, 85 o 90%, preferentemente al menos el 95 o 98%, con la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia en cuestión). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los centros activos, etc. que la secuencia en cuestión. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (esto es, restos aminoacídicos que tienen propiedades o funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología se pueden realizar a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias de fácil acceso. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el porcentaje de homología entre dos o más secuencias.

El porcentaje de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, esto es, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, de uno en uno. A esto se le denomina alineamiento «sin huecos». Típicamente, tales alineamientos sin huecos se realizan solo sobre un número relativamente pequeño de restos.

Aunque se trata de un método muy simple y repetitivo, no tiene en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias que de otro modo serían idénticas, una inserción o delección ocasionará que los siguientes restos aminoacídicos no estén alineados, lo que podría acabar dando lugar a una gran reducción del porcentaje de homología cuando se realiza el alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para que produzcan alineamientos óptimos que tengan en cuenta las posibles inserciones o delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se consigue con la inserción de 'huecos' en el alineamiento de las secuencias para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan 'penalizaciones por hueco' a cada hueco que aparece en el alineamiento, de manera que, para el mismo número de restos aminoacídicos idénticos, un alineamiento de secuencias con el menor número posible de huecos (lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas) alcanzará una puntuación mayor que una con muchos huecos. Los 'costes por hueco afín' se usan típicamente para cargar un coste relativamente elevado a la existencia de un hueco y una menor penalización para cada resto posterior en el hueco. Se trata del sistema de puntuación que más se usa. Las penalizaciones por hueco muy altas producirán, por supuesto, alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten la modificación de las penalizaciones por hueco. No obstante, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se usa este tipo de programas para comparar secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el programa BestFit del paquete de programas del GCG de la Universidad de Wisconsin, la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para el hueco y de -4 para cada extensión.

Por lo tanto, calcular el porcentaje máximo de homología requiere en primer lugar la generación de un alineamiento óptimo que tenga en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para realizar tales alineamientos es BestFit del paquete de programas del GCG de la Universidad de Wisconsin (Devereux et al. 1984 *Nuc. Acids Research* 12, p. 387). Otros ejemplos de programas que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitarse a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al. 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4.ª edición, capítulo 18), FASTA (Altschul et al. 1990 *J. Mol. Biol.* 403-410) y el paquete integrado de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas en línea y fuera de línea (véase Ausubel et al. 1999, páginas 7-58 y 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar el programa BestFit del GCG de la Universidad de Wisconsin. Una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, también está disponible para comparar secuencias de proteínas y de nucleótidos (véase *FEMS Microbiol Lett* 1999, 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999, 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el porcentaje de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento no se basa típicamente en una comparación por parejas de todo o nada. En su lugar, se utiliza generalmente una matriz de ponderación de similitud que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz usada corrientemente es la matriz BLOSUM62, que es la matriz por defecto para el paquete de programas de BLAST. Los programas del paquete del GCG de la Universidad de Wisconsin suelen utilizar tanto los valores por defecto públicos como una tabla de comparaciones simbólicas personalizada, si se le proporciona (véase el manual del usuario para más información). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete del GCG, o en el caso de otros programas, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, el porcentaje de homología se puede calcular con la aplicación de alineamiento múltiple de DNASIS™ (Hitachi Software), basada en un algoritmo análogo a CLUSTAL (Higgins D. G. y Sharp P. M. (1988), *Gene* 73(1), 237-244).

Una vez que el programa ha generado el alineamiento óptimo, se puede calcular el porcentaje de homología, preferentemente el porcentaje de identidad de secuencia. Típicamente, el programa lo realiza como parte de la

comparación de las secuencias y genera un resultado numérico.

En un aspecto preferente de la presente invención, se usan los siguientes programas y ajustes para calcular el porcentaje de homología o identidad. Para las secuencias de aminoácidos, se calcula el porcentaje de identidad (homología) o «positivos» mediante AlignX de VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 de Invitrogen Corporation, 5 Carlsbad, California, EE.UU.) para cada posible par de secuencias de aminoácidos. Los ajustes son los parámetros por defecto (penalización por apertura de hueco: -10; penalización de la extensión del hueco: 0,1).

Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de restos aminoacídicos que producen cambios silenciosos y dan lugar a una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas sobre la base de su similitud respecto a la polaridad, carga, solubilidad, hidrofilia, 10 hidrofobia, y/o la naturaleza anfipática de los restos con tal de que se mantenga la actividad de fijación secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos polares sin carga que tienen unos valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

15 Las sustituciones conservativas se pueden realizar, por ejemplo, de acuerdo con la tabla que sigue. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferentemente en la misma línea de la tercera columna se pueden sustituir entre sí:

ALIFÁTICOS	Apolar	G A P
		I L V
	Polar sin carga	C S T M
		N Q
	Polar cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

La presente invención también engloba la sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se utilizan ambos en la presente memoria para significar el intercambio de un resto de aminoácido existente por un resto alternativo) que se 20 pueda producir, esto es, sustitución entre similares, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También se puede producir la sustitución no homóloga, esto es, de una clase de resto por otra o alternativamente que implique la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (de aquí en adelante citado como Z), diaminobutirato de ornitina (de aquí en adelante citado como B), norleucina ornitina (de aquí en adelante citado como O), pirlalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

25 También se pueden realizar reemplazos con aminoácidos no naturales.

Las secuencias de aminoácidos de las variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden introducir entre dos restos aminoacídicos cualesquiera de la secuencia, que incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores aminoacídicos tales como restos de glicina o de β-alanina. Otra forma más de variación, que implica la presencia de uno o más restos aminoacídicos en forma peptoide, será 30 bien conocida para los expertos en la técnica. Para despejar las dudas, se utiliza «la forma peptoide» para referirse a variantes de restos aminoacídicos en los que el grupo sustituyente del carbono α se encuentra en el átomo de nitrógeno del resto en vez de en el carbono α. En la técnica se conocen los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoide, por ejemplo, Simon R. J. et al., *PNAS* (1992) 89 (20), 9367-9371 y Horwell D. C., *Trends Biotechnol.* (1995) 13 (4), 132-134.

35 Las secuencias nucleotídicas a utilizar en la presente invención o que codifican un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria pueden incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen muchos tipos diferentes de modificaciones de oligonucleótidos. Estas incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, hay que sobreentender que las 40 secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria se pueden modificar por cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones se pueden realizar para realizar la actividad *in vivo* o la duración esperada de las secuencias nucleotídicas.

La presente invención también engloba el uso de secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o a cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces se puede utilizar esa secuencia como sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

- 5 Los polinucleótidos que no son homólogos al 100% a las secuencias de la presente invención, pero que caen dentro del alcance de la invención, se pueden obtener de diferentes maneras.

Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria se pueden obtener, por ejemplo, al rastrear con sondas las genotecas de ADN construidas a partir de un abanico de individuos, por ejemplo individuos de poblaciones diferentes. Además, se pueden obtener otros homólogos celulares o víricos/bacterianos, en particular
10 homólogos celulares encontrados en células de mamífero (por ejemplo células de rata, de ratón, bovinas y de primate), y tales homólogos y sus fragmentos serán capaces, por lo general, de hibridarse selectivamente a las secuencias mostradas en la lista de secuencias de la presente memoria. Tales secuencias se pueden obtener al rastrear con sondas las genotecas de ADNc o las genotecas de ADN genómico construidas a partir de otras especies animales, y el rastreo de tales genotecas con sondas que comprenden toda o parte de una cualquiera de
15 las secuencias de la lista de secuencias adjunta en las condiciones de rigor de medio a elevado. Se aplican consideraciones similares para obtener homólogos de especies y variantes alélicas del polipéptido o de las secuencias de nucleótidos de la invención.

También se pueden obtener variantes y homólogos de cepas o especies utilizando la PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para hibridarse selectivamente sobre secuencias de las variantes y de los homólogos que
20 codifican las secuencias aminoacídicas conservadas de las secuencias de la presente invención. Se pueden predecir las secuencias conservadas, por ejemplo, mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias variantes u homólogos. Se pueden realizar los alineamientos de las secuencias mediante los programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se utiliza mucho el programa PileUp del paquete el GCG de la Universidad de Wisconsin.

- 25 Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de rigor más bajo que el empleado para clonar secuencias con cebadores de secuencias únicas frente a secuencias conocidas.

Alternativamente, se pueden obtener tales polinucleótidos mediante mutagénesis específica de sitio de las secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil si, por ejemplo, se necesitan cambios silenciosos de codones en las
30 secuencias para optimizar el uso preferente de codones al de una célula huésped particular en la que se van a expresar las secuencias polinucleotídicas. Se pueden desear otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar las propiedades o las funciones de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) de la invención se pueden utilizar para generar un cebador, por
35 ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con una marcación que se revela mediante los medios convencionales utilizando marcaciones radioactivas o no radioactivas, o se pueden clonar los polinucleótidos en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, preferentemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40, nucleótidos de longitud, y también quedan englobados por la terminología «polinucleótidos» de la invención tal y como se emplea en la
40 presente memoria.

Los polinucleótidos tales como polinucleótidos de ADN y sondas de acuerdo con la invención se pueden producir por recombinación, mediante síntesis o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También se pueden clonar mediante las técnicas estándares.

- 45 En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, en la que se añade un nucleótido cada vez. Las técnicas para llevar a cabo esto mediante técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Los polinucleótidos más largos se producirán por lo general utilizando medios recombinantes, por ejemplo mediante técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará la fabricación de un par de
50 cebadores (por ejemplo de unos 15 a 30 nucleótidos) que flanqueen una región de la secuencia diana del lípido, que es lo que se desea clonar, haciendo que los cebadores entren en contacto con el ARNm o el ADNc obtenido de una célula humana o animal, realizando una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que provocan la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (por ejemplo mediante la purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa), y recuperando el ADN amplificado. Los cebadores se pueden diseñar para que contengan sitios de reconocimiento adecuados para las enzimas de restricción, de modo que el ADN
55 amplificado se pueda clonar en un vector de clonación adecuado.

HIBRIDACIÓN

La presente invención también abarca el uso de secuencias que son complementarias a las secuencias de los

ácidos nucleicos de la presente invención o las secuencias que son capaces de hibridarse tanto a las secuencias de la presente invención como a las secuencias que son complementarias a éstas.

La terminología «hibridación» tal y como se utiliza en la presente memoria incluiría «el procedimiento mediante el cual una hebra de ácido nucleico se junta con una hebra complementaria mediante el apareamiento de las bases», así como el procedimiento de amplificación como el llevado a cabo en las tecnologías de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención también engloba la utilización de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse a las secuencias que son complementarias a las secuencias en cuestión que se explican en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

10 La presente invención también engloba las secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse a las secuencias de nucleótidos que se exponen en la presente memoria.

Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m) del complejo de unión de nucleótidos, tal y como se explica en Berger y Kimmel (1987, «Guide to Molecular Cloning Techniques», *Methods in Enzymology*, Vol. 152, Academic Press, San Diego, CA), y confiere un «rigor» definido que se explica más adelante:

15 El rigor máximo típicamente se produce a una $T_m - 5\text{ °C}$ (5 °C por debajo de la T_m de la sonda); el rigor alto a unos 5 °C a 10 °C por debajo de la T_m ; el rigor intermedio a unos 10 °C a 20 °C por debajo de la T_m ; y el rigor bajo a unos 20 °C a 25 °C por debajo de la T_m . Como entenderá cualquier experto en la técnica, la hibridación con el rigor máximo se puede utilizar para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas, mientras que la hibridación con un rigor intermedio (o bajo) se puede utilizar para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas relacionadas o parecidas.

Preferentemente, la presente invención engloba las secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones de rigor alto o condiciones de rigor intermedio con secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas que están definidas en la presente memoria.

25 Más preferentemente, la presente invención engloba las secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones de rigor alto (por ejemplo, 65 °C y SSC a $0,1X$ {SSC a $1X = \text{NaCl}$ a $0,15\text{ M}$, citrato de sodio a $0,015\text{ M}$, pH $7,0$ }) con las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas que están definidas en la presente memoria.

La presente invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de nucleótidos que se exponen en la presente memoria (incluidas las secuencias complementarias a las que se explican en la presente memoria).

La presente invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias que se hibridan a las secuencias de nucleótidos que se explican en la presente memoria (incluidas las secuencias complementarias a las que se exponen en la presente memoria).

30 También se incluyen dentro del alcance de la presente invención las secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridarse con las secuencias nucleotídicas que se exponen en la presente memoria en condiciones de rigor de intermedio a máximo.

En un aspecto preferente, la presente invención cubre las secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de nucleótidos que se exponen en la presente invención, o el complemento de las mismas, en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50 °C y SSC a $0,2X$).

40 En un aspecto más preferente, la presente invención cubre las secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de nucleótidos que se exponen en la presente memoria, o el complemento de las mismas, en condiciones de rigor alto (por ejemplo, 65 °C y SSC a $0,1X$).

EXPRESIÓN DE POLIPÉPTIDOS

45 Una secuencia de nucleótidos para uso en la presente invención o que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria se puede incorporar a un vector replicable recombinante. Se puede utilizar el vector para replicar y expresar la secuencia nucleotídica, en forma de polipéptido, en una célula huésped compatible y/o a partir de ella. Se puede controlar la expresión mediante secuencias de control, que incluyen promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Se pueden utilizar promotores procariotas y promotores que funcionan en las células eucariotas. Se pueden utilizar promotores específicos de tejido o específicos de estímulo. También se pueden utilizar promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes que se describen más arriba.

El polipéptido producido por una célula huésped recombinante mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos se puede secretar o se puede mantener dentro de la célula según la secuencia y/o el vector utilizado. Las

secuencias codificantes se pueden diseñar con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificantes de la sustancia a través de una membrana celular de determinados procariontes o eucariontes.

VECTOR DE EXPRESIÓN

La terminología «vector de expresión» significa una construcción capaz de producir expresión *in vivo* o *in vitro*.

- 5 Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma del organismo. La terminología «incorpora» cubre preferentemente la incorporación estable en el genoma.

La secuencia de nucleótidos de la presente invención o que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria puede estar presente en un vector, en el que la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a secuencias reguladoras, de tal forma que las secuencias reguladoras son capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos en un organismo hospedador adecuado, esto es, el vector es un vector de expresión.

Los vectores de la presente invención se pueden introducir por transformación en una célula huésped adecuada como se describe más adelante para proporcionar la expresión de un polipéptido que tiene las propiedades específicas que están definidas en la presente invención.

- 15 La elección del vector, por ejemplo plásmido, cósmido o vector fágico, dependerá a menudo de la célula huésped en la que se introduce.

Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores de selección, tales como un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, se puede llevar a cabo la selección mediante cotransformación (como se describe en la patente internacional WO 91/17243).

Se pueden utilizar los vectores *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN, o se pueden utilizar para transfectar o transformar una célula huésped.

Por esta razón, en una realización más, la invención da a conocer un método para construir secuencias de nucleótidos de la presente invención o secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades que se definen en la presente memoria mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos en un vector replicable, mediante la introducción del vector en una célula huésped compatible, y haciendo crecer la célula huésped en condiciones que conllevan la replicación del vector.

El vector puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ102.

SECUENCIAS REGULADORAS

En algunas aplicaciones, una secuencia de nucleótidos para uso en la presente invención o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria está operativamente unida a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como mediante la elección de la célula huésped. A modo de ejemplo, la presente invención cubre un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente unida a tal secuencia reguladora, a saber, el vector es un vector de expresión.

La terminología «operativamente unido» se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en la manera para la que se diseñaron. Una secuencia reguladora «operativamente unida» a una secuencia codificante está ligada de tal modo que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

La terminología «secuencias reguladoras» incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

La terminología «promotor» se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de fijación de la ARN polimerasa.

La potenciación de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima que tiene las propiedades específicas que están definidas en la presente memoria también se puede conseguir mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo promotores, péptido líder para la secreción, y regiones terminadoras.

Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención está operativamente unida al menos a un promotor.

Se conocen bien en la técnica ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de

nucleótidos en un huésped bacteriano, fúngico o de levadura.

CONSTRUCCIONES

La terminología «construcción», que es sinónima de términos tales como «conjugado», «casete» e «híbrido», incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria para uso de acuerdo con la presente invención directa o indirectamente unida a un promotor. Un ejemplo de una unión indirecta es la dotación de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia intrónica, tal como el intrón de Sh1 o el intrón de ADH, intercalado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo es cierto para la terminología «fusionado» en relación con la presente invención, que incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, la terminología no cubre la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína normalmente asociada al promotor del gen de tipo salvaje ni cuando ambos se encuentran en su medio natural.

La construcción puede incluso contener o expresar un marcador, lo que permite la selección de la construcción genética.

Para algunas aplicaciones, la construcción comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la presente invención o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria operativamente unida a un promotor.

CÉLULAS HUÉSPED

La terminología «célula huésped» en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprende o bien la secuencia de nucleótidos que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria, o bien un vector de expresión como se ha descrito más arriba y que se utiliza para la producción recombinante de un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se describen en la presente memoria.

Por este motivo, una realización adicional de la presente invención da a conocer células huésped transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos de la presente invención o una secuencia de nucleótidos que expresa un polipéptido que tiene las propiedades específicas descritas en esta memoria. Las células se elegirán para que sean compatibles con dicho vector y pueden, por ejemplo, ser células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales. Preferentemente, las células huésped no son células humanas.

Ejemplos de organismos huésped bacterianos adecuados son las especies bacterianas grampositivas o gramnegativas.

Según la naturaleza de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que tiene las propiedades específicas descritas en la presente invención, y/o si se desean procesamientos ulteriores de la proteína expresada, se podrían preferir hospedadores eucariotas tales como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura sobre las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. No obstante, algunas proteínas se secretan mal desde la célula de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en la levadura). En estos casos se debe seleccionar un organismo huésped fúngico diferente.

La utilización de células huésped adecuadas, tales como las células huésped de levadura, fúngicas y vegetales, produciría las modificaciones postraduccionales (por ejemplo miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) que se necesitarían para conferir la actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinantes de la presente invención.

La célula huésped puede ser una cepa con deficiencia de proteasas o sin proteasas.

ORGANISMO

La terminología «organismo» en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente invención y/o los productos obtenidos de la misma.

Los organismos adecuados incluirían un procarionta, un hongo, una levadura o una planta.

La terminología «organismo transgénico» en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria y/o los productos obtenidos de ésta, y/o en donde un promotor puede permitir la expresión en el organismo de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos está incorporada en el genoma del organismo.

La terminología «organismo transgénico» no cubre las secuencias codificantes nucleotídicas nativas en su medio

natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que también está en su medio natural.

- Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende una cualquiera, o combinaciones, de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria, las construcciones que se definen en la presente memoria, los
- 5 vectores que se definen en la presente memoria, los plásmidos que se definen en la presente memoria, las células que se definen en la presente memoria, o sus productos. Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria bajo el control de un promotor heterólogo.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS/ORGANISMO HUÉSPED

- 10 Tal y como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procarionta o eucarionta. Ejemplos de huéspedes procariontas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

- En una realización, la célula huésped es una bacteria, preferentemente una bacteria gramnegativa, preferentemente una célula huésped seleccionada entre *Actinobacteria*, tales como *Bifidobacteria* y *Aeromonas*, particularmente preferente *Aeromonas salmonicida*. Aún más preferente son los Actinomicetales tales como las *Corynebacteria*, en
- 15 particular *Corynebacterium glutamicum* y *Nocardia*. Particularmente preferente son las *Streptomycetaceae*, tales como *Streptomyces*, especialmente *S. lividans*.

- Se puede utilizar un huésped microbiano para expresar el gen de la galactolipasa, por ejemplo *Eubacteria*, *Archea* u hongos, incluidas las levaduras. Se prefieren las *Eubacteria*, por ejemplo *Firmicutes* (bacteria grampositiva con bajo contenido en GC), tales como *Bacillus subtilis* y otras especies de *Bacillus*, bacterias del ácido láctico tales como
- 20 especies de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

También se prefieren las bacterias gramnegativas *Proteobacteria*, en particular *Gammaproteobacteria*, tal como las especies huésped que pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Citrobacter* y *Escherichia*, en especial *Escherichia coli*.

- Preferentemente, la especie huésped es huésped de expresión grampositivo tal como *Aeromonas salmonicida*,
- 25 *Streptomyces lividans* o *Corynebacterium glutamicum*, tal y como se detalla en la solicitud de patente de Gran Bretaña número 0513859.9.

En otra realización, la célula huésped es el mismo género que la especie huésped nativa, esto es, el gen recombinante se vuelve a introducir y expresar en una especie del mismo género que la especie de la cual se aisló el gen recombinante.

- 30 En otra realización, la célula huésped es de la especie huésped nativa, esto es, el gen recombinante se vuelve a introducir y expresar en la misma especie de la cual se aisló el gen recombinante.

- En la técnica está bien documentado cómo se transforman los huéspedes procariontes, por ejemplo véase Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se usa un huésped procarionte, entonces la secuencia de nucleótidos habría que modificarla convenientemente
- 35 antes de la transformación, tal como para eliminar los intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura.

- Las células de hongos filamentosos se pueden transformar mediante distintos métodos conocidos en la técnica, tal como un procedimiento que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguido por la regeneración de la pared celular de un modo conocido. El uso de *Aspergillus* como microorganismo huésped se
- 40 describe en la patente europea EP 0 238 023.

Otro organismo hospedador puede ser una planta. Se puede encontrar una revisión de las técnicas generales utilizadas para transformar plantas en los artículos de Potrykus [*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* (1991) 45: 205-225] y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, marzo/abril 1994, 17-27). Más explicaciones sobre la transformación de las plantas se pueden encontrar en la patente europea EP-A-0449375.

- 45 En los apartados siguientes se presentan explicaciones generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas.

HONGOS TRANSFORMADOS

- Un organismo huésped puede ser un hongo, tal como un hongo filamentoso. Ejemplos de tales huéspedes adecuados incluyen cualquier miembro que pertenezca a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*,
- 50 *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

Las explicaciones sobre la transformación de los hongos filamentosos se revisan en la patente de los Estados Unidos US-A-5741665 que declara que las técnicas estándares para la transformación de los hongos filamentosos y

el cultivo de los hongos se conocen bien en la técnica. Una revisión exhaustiva de las técnicas que se aplican a *N. crassa* se encuentra, por ejemplo, en Davis y de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A:79-143.

En la patente de los Estados Unidos US-A-5674707 se revisan más explicaciones sobre la transformación de los hongos filamentosos.

- 5 En un aspecto, el organismo huésped puede ser del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

También se puede preparar un *Aspergillus* transgénico de acuerdo con la presente invención siguiendo, por ejemplo, las explicaciones de Turner G. 1994 («Vectors for genetic manipulation». En: Martinelli S. D., Kinghorn J. R. (Editores) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology*, vol. 29. Elsevier, Amsterdam, 1994, págs. 641-666).

- 10 Se ha revisado la expresión génica en los hongos filamentosos en Punt et al., (2002) *Trends Biotechnol*, 2002, mayo, 20(5): 200-6, Archer y Peberdy, *Crit. Rev. Biotechnol.* (1997), 17(4): 273-306.

LEVADURA TRANSFORMADA

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura.

- 15 Una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en la levadura se da a conocer, por ejemplo, en *Methods Mol. Biol.* (1995), 49: 341-54 y *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997), octubre 8(5): 554-60.

En este sentido, se puede utilizar la levadura, tal como las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* [véase *FEMS Microbiol. Rev.* (2000), 24(1): 45-66], como un vehículo para la expresión génica heteróloga.

- 20 Una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de los productos génicos se ofrece en E. Hinchcliffe, E. Kenny (1983, «Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes», *Yeasts*, vol. 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds., Segunda edición, Academic Press Ltd).

- 25 Para la transformación de la levadura se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, se puede preparar una *Saccharomyces* transgénica de acuerdo con la presente invención siguiendo las explicaciones de Hinnen et al., (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75, 1929); Beggs, J. D. (1978, *Nature*, Londres, 275, 104); e Ito, H. et al. (1983, *J. Bacteriology*, 153, 163-168).

Las células transformadas de levadura se pueden seleccionar mediante diversos marcadores de selección, tales como los marcadores auxótrofos dominantes de resistencia a antibióticos.

- 30 Se puede seleccionar un organismo huésped adecuado de levadura entre las especies de levadura relevantes desde el punto de vista biotecnológico, tales como, pero sin limitarse a ellas, las especies de levadura seleccionadas entre *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces*, *Yarrowinia* spp., *Saccharomyces* spp., que incluye *S. cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces* spp., que incluye *Schizosaccharomyces pombe*.

Se puede utilizar una cepa de la especie de levadura metilótrofa *Pichia pastoris* como organismo huésped.

En una realización, el organismo huésped puede ser una especie de *Hansenula*, tal como *H. polymorpha* (tal y como se describe en la patente internacional WO01/39544).

35 CÉLULAS VEGETALES/PLANTAS TRANSFORMADAS

Un organismo hospedador adecuado para la presente invención puede ser una planta. Se puede encontrar una revisión de las técnicas generales en los artículos de Potrykus [*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1991) 42: 205-225] y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, marzo/abril, 1994, 17-27), o en la patente internacional WO01/16308.

40 SECRECIÓN

A menudo, es deseable que el polipéptido se secrete desde el huésped de expresión hacia el medio de cultivo donde la enzima se puede recuperar con más facilidad. De acuerdo con la presente invención, la secuencia del péptido líder para la secreción se puede seleccionar en función del huésped de expresión deseado. También se pueden utilizar secuencias señal híbridas en el contexto de la presente invención.

- 45 Ejemplos típicos de secuencias de péptido líder para la secreción heteróloga son las que proceden del gen de la amiloglucosidasa (AG) fúngica (*glaA*, las dos versiones de 18 y 24 aminoácidos, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen de factor a (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de la α -amilasa (*Bacillus*).

DETECCIÓN

Se conocen en la técnica muy diversos protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos. Los ejemplos incluyen el inmunoensayo enzimático (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

- 5 Los expertos en la técnica conocen una amplia gama de marcadores y técnicas de conjugación, y se pueden utilizar en distintos ensayos de aminoácidos y de ácidos nucleicos.

Una serie de compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp (Cleveland, OH) proporcionan kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

- 10 Las moléculas indicadoras o los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, fluoróforos, quimioluminiscentes o cromógenos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que explican el uso de tales marcadores incluyen las patentes de los Estados Unidos US-A-3 817 837; US-A-3 850 752; US-A-3 939 350; US-A-3 996 345; US-A-4 277 437; US-A-4 275 149 y US-A-4 366 241.

Igualmente, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes tal y como se muestra en la patente de los Estados Unidos US-A-4 816 567.

15 PROTEÍNAS DE FUSIÓN

- Se puede producir un polipéptido que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria como una proteína de fusión, por ejemplo, para ayudar a la extracción y a la purificación del mismo. Ejemplos de proteínas de fusión acompañantes incluyen glutatión-S-transferasa (GST), cola de hexahistidinas, GAL4 (dominio de fijación al ADN y/o dominio de activación transcripcional) y β -galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre la proteína de fusión acompañante y la secuencia de la proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína fusionada. Preferentemente, la proteína fusionada no estorbará para la actividad de la secuencia de la proteína.
- 20

Se han revisado sistemas de expresión de fusiones génicas en *E. coli* en *Curr. Opin. Biotechnol* (1995) 6(5), 501-6.

- En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria se puede ligar a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para detectar selectivamente en las colecciones peptídicas los agentes capaces de afectar a la actividad de la sustancia, puede resultar útil codificar una sustancia química que expresa un epítipo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible en el mercado.

La invención se describirá ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

- 30 En la figura 1 se muestra el perfil de actividad de la lípido aciltransferasa (ensayo PNP-caprilato) obtenida después de la cromatografía de intercambio aniónico (CIA);

En la figura 2 se muestran los resultados de los análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fracciones de purificación de la lípido aciltransferasa (4-12% Mes, +DTT, se aplicaron 40/10 μ l de muestra en el gel):

Carril 1: muestra de la lípido aciltransferasa después de desalar, se aplicaron 40 μ l al gel

- 35 Carril 2: muestra de la lípido aciltransferasa después de desalar, se aplicaron 10 μ l al gel

Carril 3: purificación de la lípido aciltransferasa después de CIA (acumulados 27 a 39), se aplicaron 40 μ l al gel;

Carril 4: purificación de la lípido aciltransferasa después de CIA (acumulados 27 a 39), se aplicaron 10 μ l al gel;

- 40 En la figura 3 se muestra una TLC (solvente 4) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja con la lípido aciltransferasa de acuerdo con la tabla 2. Se analizó también la fosfatidilcolina (PC) a modo de referencia;

En la figura 4 se muestra una TLC (solvente 1) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja con la lípido aciltransferasa de acuerdo con la tabla 2. Se analizaron también los ácidos grasos libres (FFA) y los mono-, di-, y triglicéridos (TRI/DI/MONO) a modo de referencia;

- 45 En la figura 5 se muestra una TLC (solvente 5) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja con la lípido aciltransferasa de acuerdo con la tabla 2. Se analizaron también el colesterol (CHL) y el éster de colesterol (CHL-éster) a modo de referencia;

En la figura 6 se muestra una TLC (solvente 4) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja con la lípido aciltransferasa o Lecitase Ultra™ de acuerdo con la tabla 3 durante 20 horas;

En la figura 7 se muestra una TLC (solvente 5) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja con la lipido aciltransferasa o Lecitase Ultra™ de acuerdo con la tabla 3 durante 20 horas. Se analizaron también el éster de colesterol (CHL-éster); los mono-, di-, y triglicéridos (TRI/DI/MONO) y el estero vegetal a modo de referencia. También se indica la identificación de ácidos grasos libres (FFA);

- 5 En la figura 8 se muestra una TLC (solvente 4) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja con la lipido aciltransferasa o Lecitase Ultra™ de acuerdo con la tabla 3 durante 4 horas;

En la figura 9 se muestra una TLC (solvente 5) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja con la lipido aciltransferasa o Lecitase Ultra™ de acuerdo con la tabla 3 durante 4 horas. Se analizaron también el éster de colesterol (CHL-éster); los mono-, di-, y triglicéridos (TRI/DI/MONO) y el estero vegetal a modo de referencia. También se indica la identificación de ácidos grasos libres (FFA);

- 10

En la figura 10 se muestra la secuencia de aminoácidos de una lipido aciltransferasa (GCAT) madura mutante de *Aeromonas salmonicida* con una mutación de Asn80Asp (en concreto, el aminoácido 80 es de la secuencia madura);

En la figura 11 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 1) de una lipido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965);

- 15 En la figura 12 se muestra una secuencia consenso de Pfam00657 de la versión 6 de la base de datos (SEQ ID n.º 2);

En la figura 13 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 3) procedente del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051);

- 20 En la figura 14 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 4) procedente del organismo *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017);

En la figura 15 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 5) procedente del organismo *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (número de acceso de GenBank: NP_631558);

En la figura 16 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 6) procedente del organismo *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (número de acceso de GenBank: CAC42140);

- 25 En la figura 17 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 7) procedente del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso de GenBank: P41734);

En la figura 18 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 8) procedente del organismo *Ralstonia* (número de acceso de GenBank: AL646052);

- 30 En la figura 19 se muestra la SEQ ID n.º 10 Scoe1 en el NCBI con código de acceso CAB39707.1 GI:4539178 a proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3 (2)];

En la figura 20 se muestra una secuencia de aminoácidos como SEQ ID n.º 10 Scoe2 en el NCBI con código de acceso CAC01477.1 GI:9716139 a proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3 (2)];

En la figura 21 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 11) Scoe3 en el NCBI con código de acceso CAB88833.1 GI:7635996 a posible proteína excretada [*Streptomyces coelicolor* A3 (2)];

- 35 En la figura 22 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 12) Scoe4 en el NCBI con código de acceso CAB89450.1 GI:7672261 a posible proteína excretada [*Streptomyces coelicolor* A3 (2)];

En la figura 23 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 13) Scoe5 en el NCBI con código de acceso CAB62724.1 GI:6562793 a posible lipoproteína en el NCBI [*Streptomyces coelicolor* A3 (2)];

- 40 En la figura 24 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 14) Srim1 en el NCBI con código de acceso AAK84028.1 GI:15082088 a la proteína GDSL-lipasa [*Streptomyces rimosus*];

En la figura 25 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 15) de una lipido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC #14174);

- 45 En la figura 26 se muestra una TLC (solvente 4) de las muestras 1 a 10 de aceite de soja crudo tratado durante 20 horas con enzimas de acuerdo con la Tabla 4. PC es fosfatidilcolina añadida a 5 concentraciones diferentes (material de referencia).

En la figura 27 se muestra una TLC (solvente 5) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja crudo con la lipido aciltransferasa o Lecitase Ultra™ de acuerdo con la tabla 4 (20 horas). Se analizaron también el éster de colesterol (CHL-éster); los mono-, di-, y triglicéridos (TRI/DI/MONO) y el estero vegetal a modo de referencia. También se indica la identificación de ácidos grasos libres (FFA);

En la figura 28 se muestra la SEQ ID n.º 17 que es la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

En la figura 29 se muestra la SEQ ID n.º 18 que es la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

5 En la figura 30 se muestra el alineamiento 1;

En la figura 31 se muestra la SEQ ID n.º 19 Scoe1 en el NCBI con código de acceso CAB39707.1 GI:4539178 a proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3 (2)];

10 En la figura 32 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 25) de la construcción de fusión utilizada para la mutagénesis del gen de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila*. Los aminoácidos subrayados corresponden al péptido señal de una xilanasas;

En la figura 33 se muestra una secuencia polipeptídica de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces* (SEQ ID n.º 26);

En la figura 34 se muestra una secuencia polipeptídica de una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (SEQ ID n.º 27);

15 En la figura 35 se muestra una secuencia polipeptídica de una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (SEQ ID n.º 28);

En la figura 36 se muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Corynebacterium efficiens* GDSx de 300 aminoácidos (SEQ ID n.º 29);

20 En la figura 37 se muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Novosphingobium aromaticivorans* GDSx de 284 aminoácidos (SEQ ID n.º 30);

En la figura 38 se muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces coelicolor* GDSx de 269 aminoácidos (SEQ ID n.º 31);

En la figura 39 se muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces avermitilis* GDSx de 269 aminoácidos (SEQ ID n.º 32);

25 En la figura 40 se muestra un polipéptido de una lípido aciltransferasa de *Streptomyces* (SEQ ID n.º 33);

En la figura 41 se muestra una representación de cintas de la estructura cristalizada de 1IVN.PDB, que tiene un glicerol en el centro activo. La figura se realizó con el visualizador Deep View Swiss-PDB;

30 En la figura 42 se muestra una vista lateral de la estructura cristalizada de 1IVN.PDB con el visualizador Deep View Swiss-PDB, con glicerol en el centro activo; los restos a menos de 10Å del glicerol en el centro activo aparecen coloreados de negro;

En la figura 43 se muestra el alineamiento 2;

En la figura 44 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 34) procedente del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051) (en concreto, esta es la secuencia madura).

35 En la figura 45 se muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 35) de un mutante de la lípido aciltransferasa (GCAT) madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (en concreto, esta es la secuencia madura);

En la figura 46 se muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID n.º 36) de *Streptomyces thermosacchari*;

En la figura 47 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 37) de *Streptomyces thermosacchari*;

En la figura 48 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 38) de *Thermobifida fusca*/GDSx de 547 aminoácidos;

40 En la figura 49 se muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID n.º 36) de *Thermobifida fusca*;

En la figura 50 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 40) de *Thermobifida fusca*/GDSx;

En la figura 51 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 41) de *Corynebacterium efficiens*/GDSx de 300 aminoácidos;

En la figura 52 se muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID n.º 42) de *Corynebacterium efficiens*;

45 En la figura 53 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 43) de *S. coelicolor*/GDSx de 268

aminoácidos;

En la figura 54 se muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID n.º 44) de *S. coelicolor*;

En la figura 55 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 45) de *S. avermitilis*;

En la figura 56 se muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID n.º 46) de *S. avermitilis*;

5 En la figura 57 se muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID n.º 47) de *Thermobifida fusca*/GDSx;

En la figura 58 se muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID n.º 48) de *Thermobifida fusca*/GDSx;

En la figura 59 se muestra una TLC (solvente 4) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja crudo de acuerdo con la tabla 6. Se analizó también la fosfatidilcolina (PC) a modo de referencia. También se indican la fosfatidiletanolamina (PE) y la lisofosfatidilcolina (LPC);

10 En la figura 60 se muestra una TLC (solvente 5) de los productos de reacción del tratamiento de muestras de aceite de soja crudo de acuerdo con la tabla 6. Se usó de referencia éster de colesterol, mono-, di- y triglicéridos, y esteroles vegetales. También se indican los ácidos grasos libres (FFA);

En la figura 61 se muestra un alineamiento de la L131 y los homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* que ilustra la conservación del motivo GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), la caja GANDY, que es o bien GGND A o bien GGNDL, y el bloque HPT (que se considera que contiene la histidina catalítica). Estos tres bloques conservados están resaltados.

15

EJEMPLOS

El propósito de este estudio era investigar el posible uso de una lipasa aciltransferasa (a veces denominada en la presente memoria glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa [GCAT]) para el desgomado de aceites vegetales como el aceite de soja, el aceite de girasol o el aceite de colza.

20

Un propósito de este estudio era investigar si un mutante concreto (N80D) de la lipasa aciltransferasa es una enzima más adecuada para el desgomado. De los primeros estudios se sabe que las lipasas aciltransferasas (en particular las GCAT) catalizan la transferencia de acilo de ácido graso desde un fosfolípido a esteroides para formar lisolecitina y ésteres de esteroles.

25 El presente estudio se realizó en un modelo basado en aceite de soja refinado al que se añaden fosfatidilcolina y esteroides vegetales. Se seleccionó este modelo porque el producto de reacción era más fácil de analizar en un sistema modelo en vez de usar aceite de soja crudo.

Los procedimientos de desgomado enzimático de los aceites vegetales incluido el aceite de soja y el aceite de colza, se está expandiendo en los últimos años porque este procedimiento es más barato y da mejores resultados a la hora de eliminar las lecitinas del aceite. La enzima utilizada para el desgomado del aceite es una fosfolipasa A1 (Lecitase Ultra™ o la fosfolipasa A2 pancreática; Novozymes A/S, Dinamarca).

30

Una ventaja de la enzima de la presente invención cuando se usa para el desgomado en comparación con la fosfolipasa A1 de la técnica anterior es que la enzima de acuerdo con la presente invención facilita la formación de ésteres de colesterol durante el desgomado y contribuye a la acumulación de ésteres de esteroles, que no se consigue con el uso actual de la fosfolipasa A1 (Lecitase Ultra™).

35

Materiales y métodos.

Enzimas

- Lipasa aciltransferasa de acuerdo con la presente invención: enzima de *Aeromonas salmonicida* con una mutación Asn80Asp (aminoácido 80 de la enzima madura) (SEQ ID n.º 16 [véase la figura 10]);

40 • Lecitase Ultra (#3108) de Novozymes, Dinamarca

Aceite de soja: aceite de soja IP (artículo n.º 005018/lote n.º T-618-4)

Lecitina: L- α -fosfatidilcolina 95% vegetal (Avanti #441601)

Esterol vegetal: Generol 122 N de Henkel, Alemania.

Tocoferol: α -tocoferol (artículo n.º 050908/lote n.º 4010140554)

45

Actividad fosfolipasa**Sustrato**

En tampón HEPES a 0,05 M, pH 7, se disolvió L- α -fosfatidilcolina 95% vegetal (Avanti #441601) al 0,06%, Triton-X 100 al 0,4 % (Sigma X-100) y CaCl₂ a 5 mM.

5 Procedimiento de ensayo:

Se añadieron 400 μ l de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó en un Thermomixer de Eppendorf a 37 °C durante 5 minutos. A tiempo t = 0 min, se le añadieron 50 μ l de la solución con la enzima. También se analizó un blanco con agua en lugar de la enzima. La muestra se mezcló a 10 * 100 rpm en un Thermomixer de Eppendorf a 37 °C durante 10 minutos. A tiempo t = 10 min, el tubo Eppendorf se colocó en otro Thermomixer a 99 °C durante 10 min para detener la reacción.

Los ácidos grasos libres de las muestras se analizaron con el kit NEFA C de WAKO GmbH.

La actividad enzimática PLU-NEFA a pH 7 se calculó como micromoles de ácido graso producidos por minuto en las condiciones del ensayo.

HPTLC

15 Aplicador: Muestreador 4 automático de TLC, CAMAG.

Placa de HPTLC: 20 x 10 cm, Merck n.º 1.05641. Activada durante 30 min a 160 °C antes de usar.

Aplicación: se aplica 1 μ l de una solución al 8% de aceite en tampón a la placa de HPTLC con un aplicador automático de TLC.

Tampón de cromatografía 1: P-éter:metil-*terc*-butil éter:ácido acético 60:40:1.

20 Tampón de cromatografía 4: cloroformo:metanol:agua 75:25:4

Tampón de cromatografía 5: P-éter:metil-*terc*-butil éter:ácido acético 70:30:1

Tiempo de aplicación/elución: Tampón de cromatografía 1: 12 min

Tampón de cromatografía 4: 20 min

Tampón de cromatografía 5: 10 min

25 Desarrollo

La placa se secó en un horno a 160 °C durante 10 min, se enfrió y se sumergió en acetato de cobre al 6% en H₃PO₄ al 16%. Se secó 10 min más a 160 °C y se evaluó directamente.

EJEMPLO 1: purificación de la enzima

30 Muestra: la lípido aciltransferasa (Asn80Asp) (SEQ ID n.º 16) de muestra se filtró por un filtro de 0,8/0,22 μ m. Se recogió un filtrado de 510 ml.

Etapas 1, desalado, Sephadex 25 G, gel de 3.21 (10 cm de diámetro interno)

La columna de Sephadex se preparó como describe el fabricante (Amersham Biosciences). La columna se equilibró con tampón P-Na a 20 mM, pH 8,0. La muestra (510 ml) se aplicó a la columna a una velocidad de flujo de 25 ml/min. Se recogió una muestra de 815 ml desalados y se mantuvo a +4 °C.

35 Etapa 2. La columna de cromatografía de intercambio aniónico, gel Q-Sepharose FF (XK 50), de 300 ml se preparó como describe el fabricante (Amersham Biosciences). La columna se equilibró con tampón P-Na a 20 mM, pH 8,0. La muestra desalada se aplicó a la columna a una velocidad de flujo de 15 ml/min. La columna se lavó con tampón A. La lipasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,4 M en tampón P-Na a 20 mM (pH 8,0, tampón B). Se recogieron fracciones de 15 ml durante la cromatografía. La lipasa se eluyó a aproximadamente NaCl 0,2 M, y no se detectó ninguna actividad lipasa al ensayar las demás fracciones.

40

Ensayo enzimático con PNP-caprilato

El ensayo se realizó con PNP-caprilato como sustrato de la siguiente forma:

Se mezclaron 10 mg de sustrato disuelto en 1 ml de etanol, con 9 ml de tampón Tris-HCl a 50 mM (pH 7,3) que contenía TX100 a 0,4%.

Se incubaron 240 μ l de sustrato a 35 °C. La reacción se inició con la adición de 25 μ l de muestra o blanco. La mezcla se incubó a 35 °C durante 5 min con agitación. Con la ayuda de un espectrofotómetro, se midió continuamente a la formación de PNP 410 nm. La reacción de blanco contiene todos los componentes con tampón en lugar de muestra. Se define una unidad de lipasa como la cantidad de enzima que libera 1 μ l de ácido caprílico libre por minuto a 35 °C.

Determinación de la masa molecular y de la pureza

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en un gel Nu-PAGE 4-12% (+DTT) y se tiñó con Coomassie de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Novex, EE.UU.). El marcador de tamaños estándares fue See Blue Plus2 y se adquirió a Novex, EE.UU.

10 Resultados

El cromatograma de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico (CIA) de la lípido aciltransferasa mutante N80D se muestra en la figura 1. A las fracciones recogidas se les analizó la actividad lipasa (basándose en la actividad PNP-caprilato). La actividad de las fracciones se ilustra en la figura 1-a.

Se agruparon las fracciones que contienen actividad lípido aciltransferasa (27 a 39, 150 ml). La recuperación final de la lípido aciltransferasa parcialmente purificada fue de aproximadamente el 80% (basándose en el ensayo de PNP-caprilato).

Las fracciones de la lípido aciltransferasa purificada se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

El gel de electroforesis en poliacrilamida con SDS reveló una proteína lípido aciltransferasa con una masa molecular de aproximadamente 28 kDa. La lípido aciltransferasa parcialmente purificada contenía una impureza menor de unos 10 kDa (véase la figura 2).

Al agrupamiento de las muestras 27 a 39 de lípido aciltransferasa después de la CIA se le analizó la actividad fosfolipásica con el resultado de 20,4 PLU-7/ml.

El esquema de purificación global se presenta en la tabla 1, en la que la lípido aciltransferasa se purificó parcialmente con una recuperación del 80%.

25 Tabla 1. Purificación de la lípido aciltransferasa

Muestra	Vol.	V _{máx}	Dilución	Unidades totales	% de recuperación
Crudo (Q3+Q4)	510	1,150	100	58 650	100
Crudo desalado	815	0,697	100	56 806	97
Agrupamiento 27-39, Q-Seph	195	1,203	200	46 898	80

EJEMPLO 2: experimento de desgomado

La lípido aciltransferasa del ejemplo 1 se utilizó para los estudios de desgomado en las formulaciones mostradas en la tabla 2.

Se disolvieron esteroles vegetal, α -tocoferol y fosfatidilcolina en aceite de soja mediante el calentamiento del aceite a 90 °C. Entonces se enfrió el aceite a unos 40 °C y se añadió la enzima. La muestra se colocó a 40 °C durante 17 h con agitación y luego se sacó una muestra para análisis por HPTLC mediante la disolución de la muestra en cloroformo:metanol 2:1.

Tabla 2. Modelos de aceite de soja con α -tocoferol y esteroles vegetal usados para analizar la lípido aciltransferasa

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceite de soja	%	98	97	97	96	97	96	96	95	96	92
α -Tocoferol	%					1	1	1	1	1	1
Esterol vegetal	%			1	1			1	1	1	1
Fosfatidilcolina	%	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Agrupamiento 27-89 de lípido % aciltransferasa	1	1	1	1	4
---	---	---	---	---	---

Los resultados del análisis de HPTLC se muestran en las figuras 3 y 4.

Los resultados de TLC que se muestran en la figura 3 claramente demuestran que la fosfatidilcolina se elimina casi al 100% gracias a la adición de la lípido aciltransferasa al aceite. Solo la muestra n.º 10 contiene una pequeña cantidad de fosfatidilcolina. La muestra n.º 10 tiene la mayor cantidad de agua, lo que indica que la enzima para
5 desgomado puede funcionar mejor en formulaciones con poca agua, o bien se puede explicar por el hecho de que, como la muestra n.º 10 contiene un 5% de agua, se forma un sistema de dos fases, que podría ocasionar una pérdida de contacto entre los reactantes y la enzima.

De los resultados mostrados en la figura 4 se puede observar que se forma una pequeña cantidad de ácidos grasos, pero cuando también están disponibles el esteroil o el α -tocoferol en el aceite, es menor la cantidad de ácidos grasos
10 libres, porque los ácidos grasos de la fosfatidilcolina se transfieren al esteroil o al α -tocoferol para formar ésteres de esteroil y ésteres de tocoferol.

La formación de ésteres de colesterol se observa claramente en los resultados de la TLC mostrados en la figura 5. Hay que señalar que el material de referencia utilizado, el éster de colesterol, tiene el mismo tiempo de retención que los ésteres de esteroides vegetales.

15 EJEMPLO 3: experimento de desgomado (2)

En otro experimento, el agrupamiento 27-39 de lípido aciltransferasa tras la CIA se analizó a diferentes dosificaciones enzimáticas y concentraciones de agua en aceite de soja con fosfatidilcolina y esteroil vegetal. En este experimento también se analizó una fosfolipasa comercial, Lecitase Ultra™, en una concentración recomendada por el proveedor para el desgomado. La composición de las muestras para este experimento se muestran en la tabla 3.

20 Tabla 3. Modelo de aceite de soja con esteroil vegetal utilizado para analizar la lípido aciltransferasa y la Lecitase Ultra™.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceite de soja	%	96,6	96,6	96	92	96	92	95	92	96	92
Esteroid vegetal	%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fosfatidilcolina	%	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Agrupamiento 27-89 de lípido % aciltransferasa	%		0,4	0,4	0,4	1	1	2	2		
Lecitase Ultra™, solución al 1%	%									0,3	0,3
Agua	%	0,4		0,6	4,6	0	4	0	3	0,7	4,7
Unidades/g de aceite (PLU-7/g)		0	0,08	0,08	0,08	0,2	0,2	0,4	0,4	1,03	1,03

El esteroil vegetal y la fosfatidilcolina se disolvieron en aceite de soja mediante calentamiento a 95 °C con agitación. El aceite se enfrió a 40 °C y se le añadieron las enzimas. La muestra se mantuvo a 40 °C con agitación magnética y las muestras se sacaron después de 4 y 20 horas, y se analizaron por TLC. Los resultados del análisis de HPTLC de
25 las muestras sacadas a las 4 y 20 horas se muestra en las figuras 6 a 9.

Los resultados de HPTLC indican que la dosificación más baja de la lípido aciltransferasa (0,4%, que corresponde a 0,08 PLU/g de aceite) es suficiente para eliminar la fosfatidilcolina del aceite de soja después de 20 horas de reacción. También se observa que la dosis mayor de agua (5%) parece tener un efecto perjudicial sobre la hidrólisis de la fosfatidilcolina que lleva a cabo la lípido aciltransferasa en el aceite. Por tanto, cabe esperar que el menor
30 grado de hidrólisis en la muestra con la mayor dosis de actividad lípido aciltransferasa se explique por el hecho de que se ha añadido más agua a la muestra. Se observa lo contrario con Lecitase Ultra™, que tiene un menor grado de hidrólisis de fosfatidilcolina en la menor cantidad de agua (1%), mientras que Lecitase Ultra™ elimina casi completamente la fosfatidilcolina de la muestra con un 5% de agua.

Los resultados de la figura 7 también indican que la principal parte del esteroil vegetal se convierte en éster de

esterol vegetal en las muestras tratadas con la lípido aciltransferasa, mientras que no se forma ningún éster de esteroles en las muestras tratadas con Lecitase Ultra™. La figura 7 indica que Lecitase Ultra™ produce más ácidos grasos libres (FFA) que la lípido aciltransferasa.

Conclusión

- 5 Los experimentos de desgomado con un modelo de aceite de soja que contiene fosfatidilcolina, esteroles vegetales y tocoferol han mostrado que una enzima lípido aciltransferasa parcialmente purificada es capaz de eliminar toda la fosfatidilcolina a la vez que forma ésteres de esteroles vegetales, y solo se forma una pequeña cantidad de ácidos grasos libres.

- Una ventaja más de la lípido aciltransferasa es la formación de ésteres de esteroles, y en particular de ésteres de tocoferol, porque los ésteres de esteroles (incluido el éster de tocoferol) proporcionan propiedades beneficiosas para la salud. En un procesado convencional de un aceite comestible, tras el desgomado, la fase acuosa que contiene los lípidos polares hidrolizados (por ejemplo, fosfolípidos y/o glucolípidos) está separada del aceite. Convencionalmente, los esteroles se eliminan del aceite comestible durante el refinado del aceite (lo que a veces se denomina desodorización). Sin embargo, los ésteres de esteroles (y ésteres de tocoferol) resisten la desodorización y, por este motivo, permanecen en el aceite. La acumulación de ésteres de esteroles en el aceite es atractiva porque se ha demostrado que una mayor ingesta de ésteres de esteroles vegetales reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares en los humanos.

El experimento también indica que la lípido aciltransferasa es capaz de sintetizar ésteres de tocoferol, que también se acumulan en el aceite.

- 20 Esto contribuirá a mejorar la estabilidad oxidativa del aceite y, por esta razón, supone un beneficio adicional para el uso de la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención para el desgomado.

EJEMPLO 4: experimento de desgomado en aceite crudo

- En otro experimento, el agrupamiento 27-39 de la lípido aciltransferasa tras la CIA se analizó a diferentes dosis de enzima y concentraciones de agua en aceite de soja crudo (antes del desgomado) obtenido de The Solae Company, Aarhus, Dinamarca. En este experimento también se analizó una fosfolipasa comercial, Lecitase Ultra™, a una concentración recomendada por el proveedor para el desgomado. La composición de las muestras para este experimento se muestra en la tabla 4.

Las muestras se colocaron en un bloque calefactor a 40 °C con agitación con un agitador magnético. Las muestras para el análisis se tomaron después de 20 h.

- 30 Tabla 4

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceite de soja crudo	%	99,5	99,5	99	98	97	98	95	99,7	99	95
Lípido aciltransferasa	%		0,5	1	1	1	2	5			
Lecitase Ultra™ #3108, solución al 1%	%								0,3	0,3	0,3
Agua	%	0,5	0	0	1	2	0	0	0	0,7	4,7

Las muestras de aceite se analizaron por HPTLC y los resultados se muestran en las figuras 26 y 27.

- Los análisis de TLC de la figura 26 indican que la lípido aciltransferasa elimina con eficacia los fosfolípidos del aceite de soja crudo sin dejar ninguna lisolecitina en la muestra (muestras 3, 4, 6 y 7). La Lecitase Ultra™ también elimina los fosfolípidos (PC), pero quedan algunas bandas en el cromatograma, que se espera que sea lisolecitina. También se observa que la lípido aciltransferasa funciona en un medio con muy poca agua, pero que la Lecitase Ultra™ necesita de un 1% a un 5% de agua para funcionar.

- Los resultados de la figura 27 confirman que la lípido aciltransferasa convierte el esteroles libres en ésteres de esteroles, y que Lecitase Ultra™ no actúa sobre los esteroles. La figura 27 también indica que se forman algunos ácidos grasos libres tanto en las muestras con lípido aciltransferasa como con Lecitase Ultra™. La razón para esta formación de ácidos grasos libres con la lípido aciltransferasa se explica por el hecho de que no hay suficientes dadores de acilo (esteroles) disponibles, y por lo tanto se produce algo de hidrólisis.

Las muestras 1, 2, 3, 6, 8 y 10 de la tabla 4 se analizaron por GLC y se cuantificó la cantidad de esteroles y ésteres de esteroles. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Análisis por GLC del esteroles y los ésteres de esteroles en el aceite de soja crudo tratado enzimáticamente (tabla 4)

Muestra n.º	Enzima	Esterol (%)	Éster de esteroles (%)
1	Control	0,25	0,07
2	Agrupamiento 27-39 de lípido aciltransferasa al 0,5%	0,13	0,13
3	Agrupamiento 27-39 de lípido aciltransferasa al 1%	0	0,26
6	Agrupamiento 27-39 de lípido aciltransferasa al 2%	0	0,22
8	0,3% de solución de Lecitase Ultra™ al 1%	0,25	0,03
10	0,3% de solución de Lecitase Ultra™ al 1% + agua al 5%	0,27	0,05

- 5 Los resultados de la tabla 5 confirman la capacidad de la lípido aciltransferasa de la presente invención para convertir todos los esteroides del aceite de soja crudo en ésteres de esteroles, y se muestra que una fosfolipasa comercial, Lecitase Ultra™, no tiene efecto sobre el esteroles.

CONCLUSIÓN

- 10 El efecto de la lípido aciltransferasa de la presente invención sobre el aceite de soja crudo confirma que la lípido aciltransferasa de la presente invención elimina con eficacia los fosfolípidos del aceite de soja crudo a la vez que forma ésteres de esteroles.

EJEMPLO 5

En otro experimento, la fosfolipasa de *Streptomyces thermosacchari* L131 se analizó en aceite de soja crudo.

- 15 Los resultados confirman que la fosfolipasa de *Streptomyces thermosacchari* L131 hidroliza con eficacia los fosfolípidos del aceite de soja crudo y es una enzima adecuada alternativa para el desgomado de los aceites vegetales.

- 20 Los procesos de desgomado enzimático de los aceites vegetales, que incluyen el aceite de soja y el aceite de colza, se encuentran en expansión en la actualidad porque este proceso es menos costoso y elimina mejor las lecitinas de los aceites vegetales. La enzima comercial que se utiliza para el desgomado de aceites es una fosfolipasa A1 microbiana o una fosfolipasa A2 procedente de animales.

Otra enzima que se puede utilizar para el desgomado es una (fosfo)lípido aciltransferasa de *Streptomyces thermosacchari* L131.

Introducción

- 25 El propósito de este estudio fue el de investigar el posible uso de una lípido aciltransferasa de *Streptomyces thermosacchari* L131 para desgomar los aceites vegetales como el aceite de soja, el aceite de girasol y el aceite de colza.

- 30 Tradicionalmente se han utilizado dos procedimientos para el desgomado de aceites, a saber, el desgomado físico y el desgomado químico. El desgomado enzimático de los aceites se desarrolló en los años 90 del siglo XX, con el uso de una fosfolipasa pancreática. Como esta enzima no era *kosher*, se sustituyó la fosfolipasa por una fosfolipasa A1 microbiana. El procedimiento enzimático posee varias ventajas sobre los procedimientos físico o químico de desgomado, que incluyen ahorro de costes, más rendimiento y un impacto medioambiental más deseable.

- 35 El propósito de este estudio fue el de investigar si la lípido aciltransferasa de *Streptomyces thermosacchari* L131 sería una enzima adecuada para el desgomado. De los estudios descritos más arriba se sabe que *Streptomyces thermosacchari* L131 tiene propiedades hidrolíticas frente a los galactolípidos y a los fosfolípidos sin mostrar ninguna actividad sobre los triglicéridos, y cabe esperar que esta enzima también facilite las reacciones transferásicas en determinados medios con poca agua. Este estudio se realizó con aceite de soja crudo con el contenido natural de fosfolípidos.

Materiales y métodos**Enzima**

K371 (jour 2390-30): *Streptomyces thermosacchari* L131/S. *lividans* liofilizados sobre almidón (actividad: 108 PLU-7/g).

- 5 Lecitase Ultra™ (#3108) de Novozymes, Dinamarca.

Colesterol, Fluka 26950

Esterol vegetal: general 122 N de Henkel, Alemania

Aceite de soja crudo de The Solae Company, Aarhus, Dinamarca.

Lecitina: L- α -fosfatidocolina 95% vegetal (Avanti #441601)

10 Actividad fosfolipasa**Sustrato:**

En tampón HEPES a 0,05 M, pH 7, se disolvieron L- α -fosfatidocolina 95% vegetal (Avanti #441601) al 0,6%, Triton-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl₂ a 5 mM.

Procedimiento del ensayo:

- 15 Se añadieron 400 μ l de sustrato en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó en un Thermomixer de Eppendorf a 37 °C durante 5 min. A tiempo t = 0 min se le añadieron 50 μ l de la solución con la enzima. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló a 10*100 rpm en un Thermomixer de Eppendorf a 37 °C durante 10 min. A tiempo t = 10 min, se detuvo la reacción al colocar el tubo Eppendorf en otro Thermomixer a 99 °C durante 10 min.
- 20 El contenido de ácidos grasos libres en las muestras se analizó con el kit NEFA C de WAKO GmbH.

La actividad enzimática PLU-NEFA a pH 7 se calculó como micromoles de ácido graso producidos por minuto en las condiciones del ensayo.

GLC (cromatografía de gases)

- 25 Cromatografía de gases capilar 8429 de Perkin Elmer equipada con una columna de sílice fundido WCOT de 12,5 x 0,25 mm de diámetro interno x 1 μ m con fenilmetilsilicona al 5% (CP Sil 8 CB de Crompack).

Portador: Helio

Inyección: 1,5 μ l con división de flujo

Detector: FID. 385 °C.

	Programa del horno:	1	2	3	4
30	Temperatura del horno [°C]	80	200	240	360
	Isotérmica, tiempo [min]	2	0	0	10
	Velocidad de temperatura [°C/min]	20	10	12	

- Preparación de la muestra: los lípidos extraídos de una muestra de 0,2 g se disolvieron en 2 ml de heptano:piridina 2:1 que contenía una estándar interno de heptadecano, 2 mg/ml. Los 500 μ l de muestra se transfirieron a un vial con cierre a presión. Se le añadieron 100 μ l de MSTFA (*N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y la reacción se incubó a 90 °C durante 15 minutos.
- 35

HPTLC

Aplicador: muestreador automático de TLC 4, CAMAG.

Placa de HPTLC: 10 x 10 cm, Merck n.º 1.05641. Activación de 30 min a 160 °C antes de usar.

- 40 Aplicación: a la placa de HPTLC se le aplicó 1 μ l de una solución al 8% de aceite en tampón con un aplicador automático de TLC.

Tampón de cromatografía 4: cloroformo:metanol:agua 75:25:4

Tampón de cromatografía 5: P-éter:metil-*terc*-butil éter:ácido acético 70:30:1

Tiempo de aplicación/elución:

Tampón de cromatografía 4: 20 min

Tampón de cromatografía 5: 10 min.

5 Desarrollo

La placa se secó en un horno durante 10 min a 160 °C, se enfrió y se sumergió en acetato de cobre al 6% en H₃PO₄ al 16%. Se secó otros 10 min más a 160 °C y se evaluó directamente.

Resultados

Experimento de desgomado

10 Para los estudios de desgomado de las formulaciones mostradas en la tabla 6 se utilizó *Streptomyces thermosacchari* L131.

Las muestras se colocaron a 40 °C durante 18 horas con agitación, después de lo cual se recogieron las muestras para el análisis de HPTLC mediante la disolución de la muestra en cloroformo:metanol 2:1.

Tabla 6. Desgomado del aceite de soja crudo con *Streptomyces thermosacchari* L131 y Lecitase Ultra™.

		1	2	3	4	5	6
Aceite de soja crudo	%	99	99	98	97	99,7	99
K371 al 10% en agua	%		1	2	3		
Lecitase Ultra™ #3108, al 1% en agua	%					0,3	0,3
Agua	%	1	0	0	0		0,7

15 Los resultados del análisis de HPTLC se muestran en las figuras 59 y 60.

En la figura 59 se muestra la TLC (solvente 4) de los productos de reacción del tratamiento enzimático de las muestras de aceite de soja crudo de acuerdo con la tabla 6. Como referencia también se analizó fosfatidilcolina (PC). También se indican la fosfatidiletanolamina (PE) y la lisofosfatidilcolina (LPC).

20 En la figura 60 se muestra la TLC (solvente 5) de los productos de reacción del tratamiento enzimático de la muestras de aceite de soja crudo de acuerdo con la tabla 6. Las referencias son éster de colesterol, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, y esteroles vegetales. También se indican los ácidos grasos libres (FFA).

25 Los resultados de la TLC en la figura 59 muestran claramente que la fosfatidilcolina se retiró completamente cuando se añadió al aceite *Streptomyces thermosacchari* L131. Solo la dosis más baja (muestra 2) no hidrolizó completamente los fosfolípidos. Lecitase Ultra™ también hidrolizó los fosfolípidos en el aceite cuando había un 5% de agua (muestra 6), pero sin añadir más agua (muestra 5), solo se hidrolizaron parte de los fosfolípidos.

Los resultados en la figura 60 indican que la hidrólisis de los fosfolípidos coincide con la formación de ácidos grasos libres.

Conclusión.

30 La lipasa de *Streptomyces thermosacchari* L131 hidroliza con eficacia los fosfolípidos en el aceite de soja crudo durante la formación de los ácidos grasos libres.

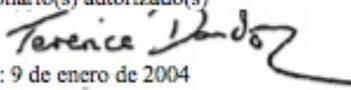
TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Escherichia coli TOP10pPet12aAhydro	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 41204
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I más arriba se acompaña de <input type="checkbox"/> una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marque con una X donde corresponda)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
La Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió el 22 de diciembre de 2003 (fecha del depósito original)	
IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió en esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y la petición de conversión del depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest se recibió el (fecha de recepción de la petición de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd, Dirección: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Scotland, UK.	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)  Fecha: 9 de enero de 2004

1 Donde se aplica la norma 6/4(d), tal fecha es la fecha en la que adquirió estatus de Autoridad Depositaria Internacional
De BP/4 (única página)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

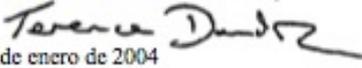
NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A
QUIEN SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE
VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: COMO ANTES Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 41204 Fecha del depósito o de la transferencia ¹ 22 de diciembre de 2003
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II más arriba se comprobó el 22 de diciembre de 2003. ² En la misma fecha, dicho organismo era:	
<input checked="" type="checkbox"/>	Viable
<input type="checkbox"/>	Ya no era viable

¹ Indique la fecha del depósito original o, cuando se haya hecho un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha más relevante (fecha del nuevo depósito o fecha de la nueva transferencia).

² En los casos referidos a la norma 10.2(a)(ii) y (iii), refiérase al análisis de viabilidad más reciente

³ Marque con una X la casilla correspondiente

IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO EL ANÁLISIS DE VIABILIDAD ⁴	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd. Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Scotland	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)  Fecha: 9 de enero de 2004

* Rellene esta hoja si se ha pedido la información y si los resultados del análisis fueron negativos.

De BP/9 (segunda y última página)

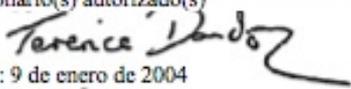
TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Escherichia coli TOP10pPet12aAsalmo	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 41205
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I más arriba se acompaña de <input type="checkbox"/> una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marque con una X donde corresponda)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
La Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió el 22 de diciembre de 2003 (fecha del depósito original)	
IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió en esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y la petición de conversión del depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest se recibió el (fecha de recepción de la petición de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd, Dirección: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Scotland, UK.	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)  Fecha: 9 de enero de 2004

1 Donde se aplica la norma 6/4(d), tal fecha es la fecha en la que adquirió es status de Autoridad Depositaria Internacional
De BP/4 (única página)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A
QUIEN SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE
VIABILIDAD

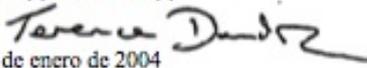
I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: COMO ANTES Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 41205 Fecha del depósito o de la transferencia ¹ 22 de diciembre de 2003
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II más arriba se comprobó el 22 de diciembre de 2003. ² En la misma fecha, dicho organismo era:	
<input checked="" type="checkbox"/>	Viable
<input type="checkbox"/>	Ya no era viable

¹ Indique la fecha del depósito original o, cuando se haya hecho un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha más relevante (fecha del nuevo depósito o fecha de la nueva transferencia).

² En los casos referidos a la norma 10.2(a)(ii) y (iii), refiérase al análisis de viabilidad más reciente

³ Marque con una X la casilla correspondiente

De BP/9 (primera página)

IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO EL ANÁLISIS DE VIABILIDAD ⁴	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd. Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Scotland	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)  Fecha: 9 de enero de 2004

⁴ Rellene esta hoja si se ha pedido la información y si los resultados del análisis fueron negativos.

De BP/9 (segunda y última página)

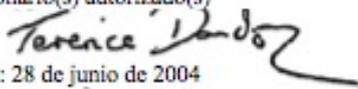
TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Streptomyces sp. L130	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 41226
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I más arriba se acompaña de	
<input type="checkbox"/>	una descripción científica
<input checked="" type="checkbox"/>	una designación taxonómica propuesta
(Marque con una X donde corresponda)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
La Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió el 23 de junio de 2004 (fecha del depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió en esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y la petición de conversión del depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest se recibió el (fecha de recepción de la petición de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd,	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)
Dirección: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Scotland, UK.	 Fecha: 28 de junio de 2004

¹ Donde se aplica la norma 6/4(d), tal fecha es la fecha en la que adquirió es status de Autoridad Depositaria Internacional

De BP/4 (única página)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A
QUIEN SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE
VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: COMO ANTES Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 41226 Fecha del depósito o de la transferencia ¹ 23 de junio de 2003
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II más arriba se comprobó el 25 de junio de 2003. ² En la misma fecha, dicho organismo era: <input checked="" type="checkbox"/> Viable <input type="checkbox"/> Ya no era viable	

¹ Indique la fecha del depósito original o, cuando se haya hecho un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha más relevante (fecha del nuevo depósito o fecha de la nueva transferencia).

² En los casos referidos a la norma 10.2(a)(ii) y (iii), refiérase al análisis de viabilidad más reciente

³ Marque con una X la casilla correspondiente

De BP/9 (primera página)

IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO EL ANÁLISIS DE VIABILIDAD⁴	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd. Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Scotland	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)  Fecha: 28 de junio de 2004

* Rellene esta hoja si se ha pedido la información y si los resultados del análisis fueron negativos.

De BP/9 (segunda y última página)

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Streptomyces sp. L131	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCMB 41227
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en I más arriba se acompaña de <input type="checkbox"/> una descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marque con una X donde corresponda)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
La Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió el 23 de junio de 2004 (fecha del depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado en I más arriba, que se recibió en esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y la petición de conversión del depósito original en un depósito bajo el Tratado de Budapest se recibió el (fecha de recepción de la petición de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCMB Ltd, Dirección: 23 St Machar Drive, Aberdeen AB24 3RY Scotland, UK.	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)  Fecha: 28 de junio de 2004

¹ Donde se aplica la norma 6/4(d), tal fecha es la fecha en la que adquirió es status de Autoridad Depositaria Internacional

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA
LOS PROPÓSITOS DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

Danisco A/S
Langebrogade 1
DK-1001 Copenhagen
Denmark

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECIBIDO EN CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL
registrado según la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de la página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE A
QUIEN SE EXPIDE LA DECLARACIÓN DE
VIABILIDAD

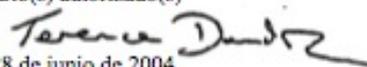
I. DEPOSITANTE	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: COMO ANTES Dirección:	Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 41227 Fecha del depósito o de la transferencia ¹ 23 de junio de 2003
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en II más arriba se comprobó el 25 de junio de 2003. ² En la misma fecha, dicho organismo era:	
<input checked="" type="checkbox"/>	Viable
<input type="checkbox"/>	Ya no era viable

¹ Indique la fecha del depósito original o, cuando se haya hecho un nuevo depósito o una nueva transferencia, la fecha más relevante (fecha del nuevo depósito o fecha de la nueva transferencia).

² En los casos referidos a la norma 10.2(a)(ii) y (iii), refiérase al análisis de viabilidad más reciente

³ Marque con una X la casilla correspondiente

De BP/9 (primera página)

IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO EL ANÁLISIS DE VIABILIDAD*	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: NCIMB Ltd., Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Scotland	Firma(s) de persona(s) que tienen potestad para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de funcionario(s) autorizado(s)  Fecha: 28 de junio de 2004

* Rellene esta hoja si se ha pedido la información y si los resultados del análisis fueron negativos.

De BP/9 (segunda y última página)

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de desgomado enzimático de aceites comestibles, que comprende tratar el aceite comestible con una lípido aciltransferasa de manera que se transfiere un grupo acilo desde una parte principal del fosfolípido a uno o más aceptores de acilo, en donde el aceptor de acilo es uno o más esteroides y/o estanoles, y en donde la lípido aciltransferasa se caracteriza por que:
- 5 (a) la lípido aciltransferasa posee actividad aciltransferásica que se define como actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un dador de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y
- (b) la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los restos aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S,
- 10 y en donde, cuando se alinea a la secuencia consenso Pfam 00657 y/o a la SEQ ID n.º 37, la lípido aciltransferasa presenta un bloque GANDY.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se forma un éster de esteroide y/o un éster de estanol.
- 15 **3. Un** procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el aceptor de acilo es un esteroide.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fosfolípido es una lecitina.
5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lípido aciltransferasa, además de ser capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroide y/o un estanol, también transfiere el grupo acilo desde un lípido a uno o más de un glúcido, una proteína, una subunidad proteica y glicerol.
- 20 6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa natural.
7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa variante.
- 25 8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha lípido aciltransferasa se puede obtener a partir de un organismo de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* y *Corynebacterium*.
- 30 9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha lípido aciltransferasa se puede obtener a partir de uno o más de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Desulfotobacterium dehalogenans*, *Bacillus*, *sp*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* y *Corynebacterium efficiens*.
- 35 10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la X del motivo GDSX es L.
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ n.º 1, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, o SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 16, SEQ ID n.º 17, SEQ ID n.º 18, SEQ ID n.º 36, SEQ ID n.º 38, SEQ ID n.º 40, SEQ ID n.º 41, SEQ ID No 45, SEQ ID n.º 47, SEQ ID n.º 50 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más con ellas.
- 45 12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 3, SEQ ID No, 4, SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más con ellas.
- 50 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 36, SEQ ID No, 38, SEQ ID n.º 40, SEQ ID n.º 41, SEQ ID

No 45, SEQ ID n.º 47, SEQ ID n.º 50, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 70% o más con ellas.

14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 17 o SEQ ID n.º 18, o una secuencia de aminoácidos que
5 tiene una homología de al menos el 70% con ellas.

15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 75% o más con ella.

16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia
10 de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16.

17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la lípido aciltransferasa se caracteriza por que la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que la X es uno o más de los restos aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y en el que la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con una secuencia madre en uno cualquiera o varios de los restos
15 aminoácidos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7.

18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la lípido aciltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 19, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 25, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 27, SEQ ID n.º 28, SEQ ID n.º 29, SEQ
20 ID n.º 30, SEQ ID n.º 31, SEQ ID n.º 32, o SEQ ID n.º 33, salvo por una o más modificaciones de aminoácido en uno cualquiera o varios de los restos aminoácidos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7 identificados por alineamiento de secuencias con la SEQ ID n.º 34.

19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia presentada como SEQ ID n.º 34 o SEQ ID n.º 35, salvo por una o más modificaciones de aminoácido en uno
25 cualquiera o varios de los restos aminoácidos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7.

20. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7, 17 o 18, en el que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16 o una secuencia de aminoácidos con una homología del 75% o más con ella.

30 21. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7, 17 o 18, en el que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16.

22. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que hay menos de un 1% de agua en el aceite comestible durante el tratamiento.

23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que hay menos del 0,5% de agua.

35 24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en el que hay menos del 0,1% de agua.

25. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el procedimiento comprende la eliminación de lisofosfolípidos producida por la acción de la lípido aciltransferasa por filtración.

26. Uso de una lípido aciltransferasa caracterizado por que:

(a) la lípido aciltransferasa posee actividad aciltransferásica que se define como actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un dador de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y
40

(b) la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los restos aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y en donde cuando se alinea a la secuencia consenso de Pfam00657 y/o a la SEQ ID n.º 37, la lípido aciltransferasa tiene un bloque GANDY, en el desgomado de aceites comestibles para eliminar los fosfolípidos y para aumentar la formación de ésteres de esteroles y/o ésteres de estanol en el aceite.
45

27. Uso de acuerdo con la reivindicación 26, en la que no hay aumento significativo de los ácidos grasos libres en el aceite tras el tratamiento.

28. Uso de acuerdo con la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en la que el fosfolípido es una lecitina.

50 29. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en la que la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa natural.

- 30.** Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en la que la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa variante.
- 31.** Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en la que dicha lípido aciltransferasa se puede obtener de a partir de organismos de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*,
5 *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfibacterium*, *Bacillus*,
Campylobacter, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*,
Mesorhizobium, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Candida*, *Thermobifida* y *Corynebacterium*
- 32.** Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, en la que la lípido aciltransferasa se puede obtener a partir de uno o más de: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*,
10 *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces thermosacchari*. *Streptomyces avermitilis*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*,
Lactococcus lactis, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*,
Desulfibacterium dehalogenans, *Bacillus sp*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataricus*,
15 *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monacytogenes*,
Neisseria meningitidis, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*,
Xanthomonas axonopodis *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* y *Corynebacterium efficiens*.
- 33.** Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en la que la X del motivo GDSX es L.
- 34.** Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, en la que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5,
20 SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 9, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, o SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 16, SEQ ID n.º 17, SEQ ID n.º 18, SEQ ID n.º 36, SEQ ID n.º 38,
SEQ ID n.º 40, SEQ ID n.º 41, SEQ ID No 45, SEQ ID n.º 47, SEQ ID n.º 50 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 75% con ellas.
- 35.** Uso de acuerdo con la reivindicación 34, en a que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 15, o una secuencia
25 de aminoácidos que tiene una identidad del 75% o más con ellas.
- 36.** Uso de acuerdo con la reivindicación 34, en la que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID n.º 36, SEQ ID n.º 38, SEQ ID n.º 40, SEQ ID n.º 41, SEQ ID No 45,
SEQ ID n.º 47, SEQ ID n.º 50, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 70% con ellas.
- 37.** Uso de acuerdo con la reivindicación 34, en la que la lípido aciltransferasa comprende una o más de SEQ ID n.º 17 o SEQ ID n.º 18, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 70% o más con ellas.
30
- 38.** Uso de acuerdo con la reivindicación 34, en la que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 75% o más con ella.
- 39.** Uso de acuerdo con la reivindicación 34, en la que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16.
35
- 40.** Uso de acuerdo con la reivindicación 30, en la que la lípido aciltransferasa se caracteriza por que la enzima comprende el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los restos aminoacídicos
40 siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S, y en donde la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácido en comparación con la enzima madre en uno cualquiera o varios de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7.
- 41.** Uso de acuerdo con la reivindicación 40, en la que la lípido aciltransferasa comprende una secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 35, SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6,
45 SEQ ID n.º 7, SEQ ID n.º 8, SEQ ID n.º 19, SEQ ID n.º 10, SEQ ID n.º 11, SEQ ID n.º 12, SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14, SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 15, SEQ ID n.º 25, SEQ ID n.º 26, SEQ ID n.º 27, SEQ ID n.º 28, SEQ ID n.º 29,
SEQ ID n.º 30, SEQ ID n.º 31, SEQ ID n.º 32, o SEQ ID n.º 33, salvo por una o más modificaciones de aminoácido en uno cualquiera o varios de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7 identificados por alineamiento de secuencias con la SEQ ID n.º 34.
- 42.** Uso de acuerdo con la reivindicación 41, en la que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia presentada como SEQ ID n.º 34 o SEQ ID n.º 35, salvo en una o más modificaciones de aminoácido en uno cualquiera o varios
50 de los restos aminoacídicos definidos en el conjunto 2 o en el conjunto 4 o en el conjunto 6 o en el conjunto 7.
- 43.** Uso de acuerdo con la reivindicación 30, en la que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16 o una secuencia de aminoácidos con una homología del 75% o más con ella.

44. Uso de acuerdo con la reivindicación 43, en la que la lípido aciltransferasa comprende la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID n.º 16.

45. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 44, en la que hay menos de un 1% de agua en el aceite comestible durante el tratamiento.

5 **46.** Uso de acuerdo con la reivindicación 45, en la que hay menos de un 0,5% de agua.

47. Uso de acuerdo con la reivindicación 46, en la que hay menos de un 0,1% de agua.

FIGURA 1

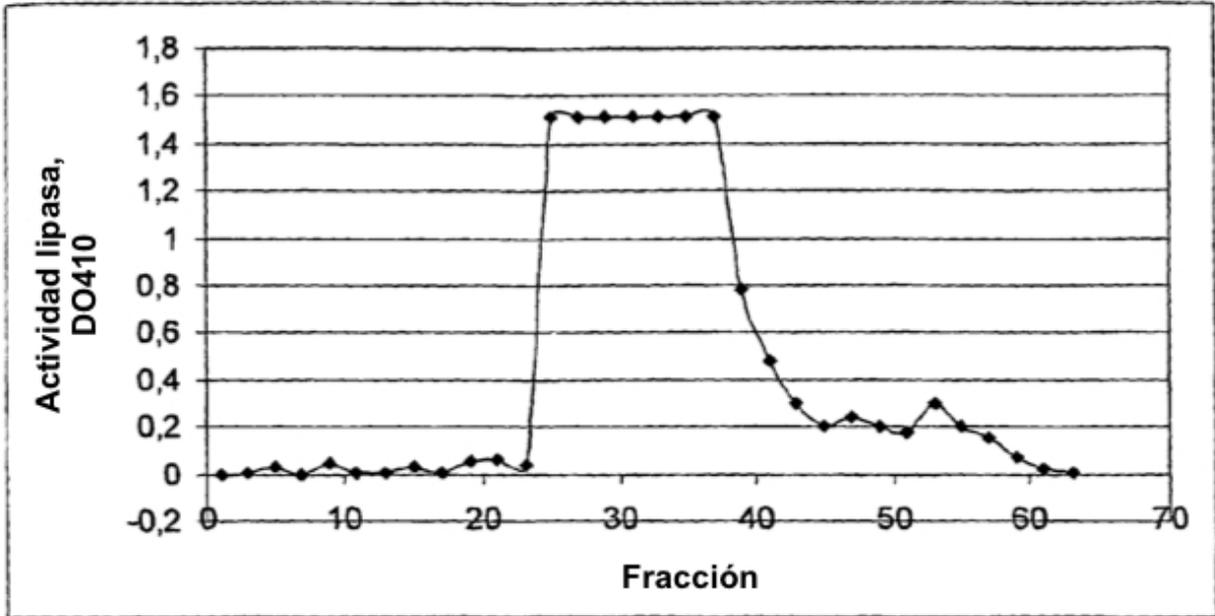


FIGURA 2

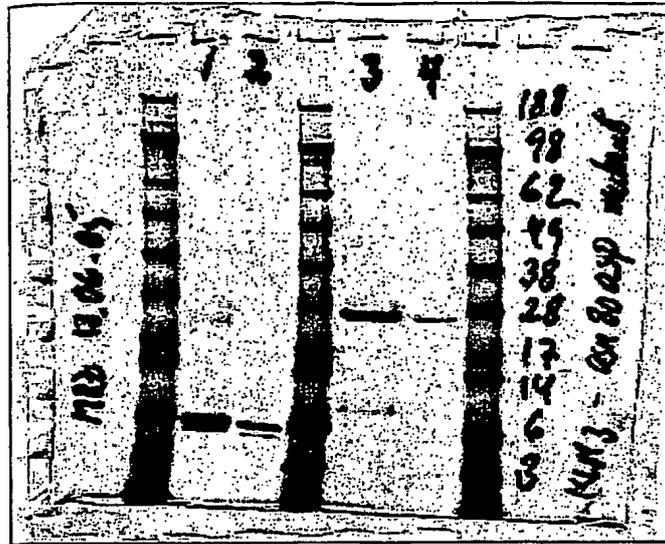


FIGURA 3

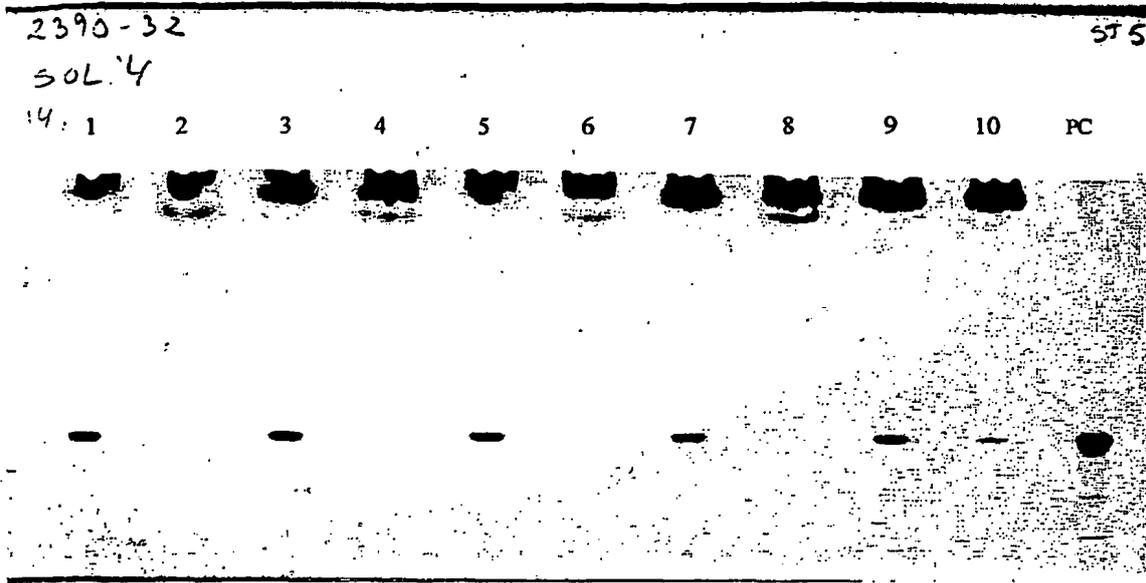


FIGURA 4

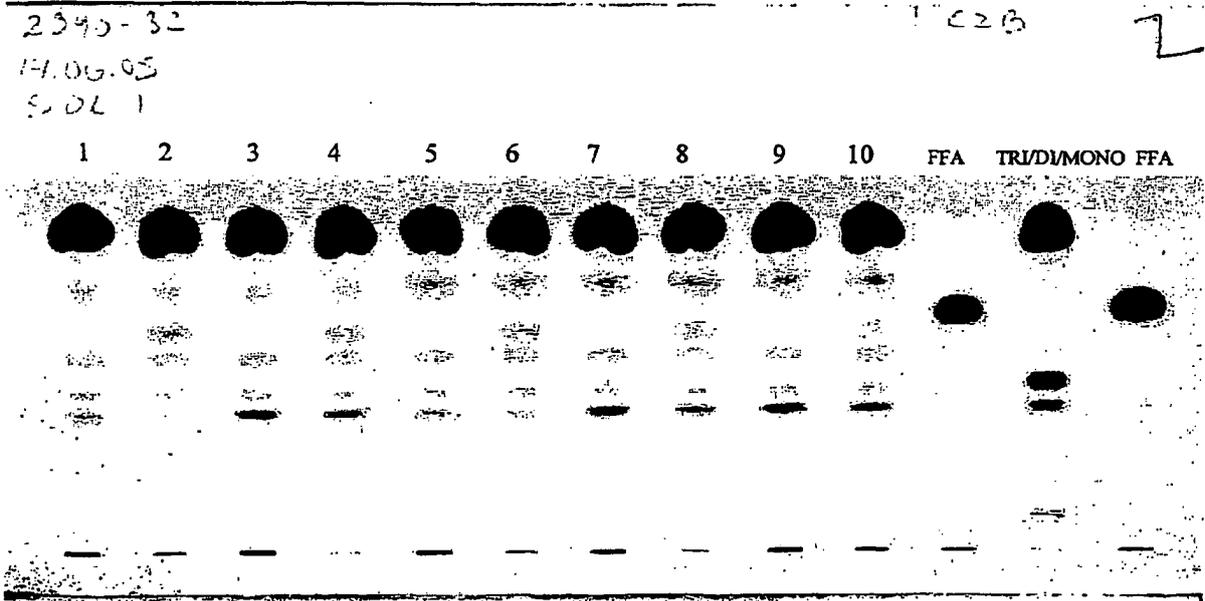


FIGURA 5

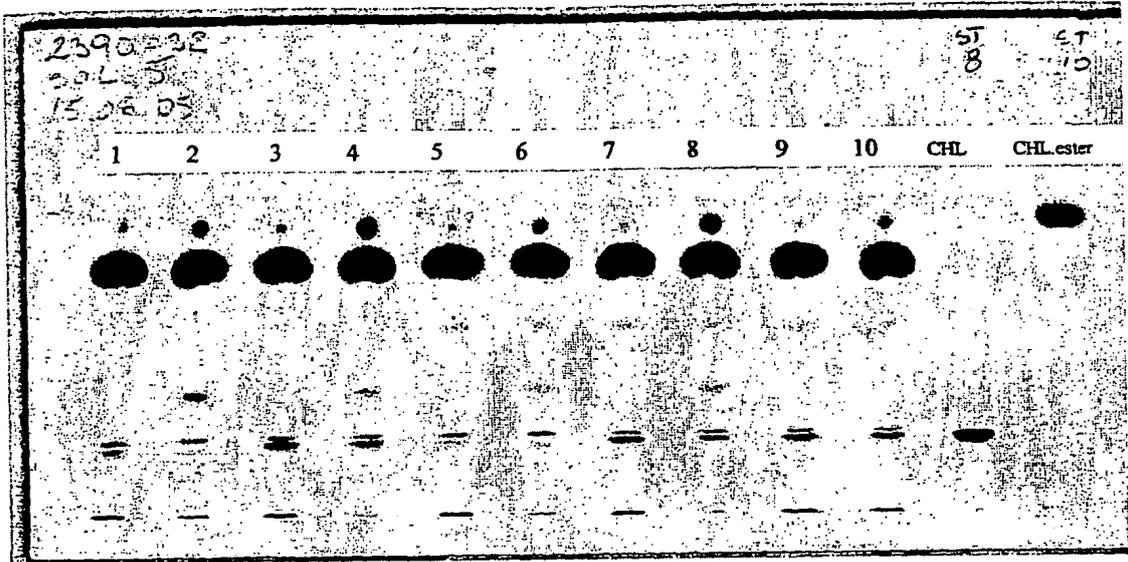


FIGURA 6

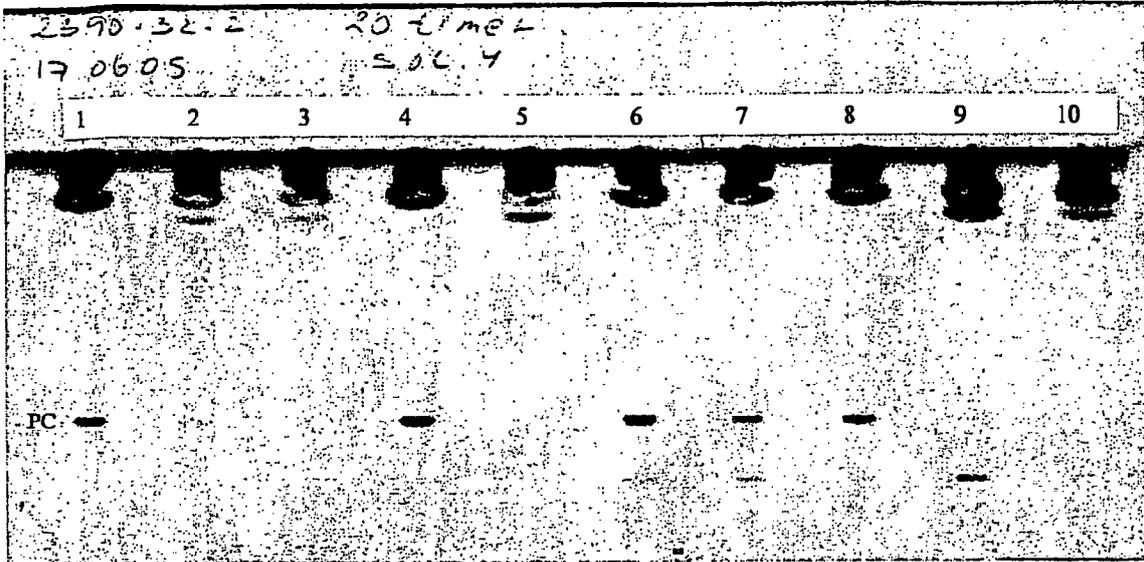


FIGURA 7

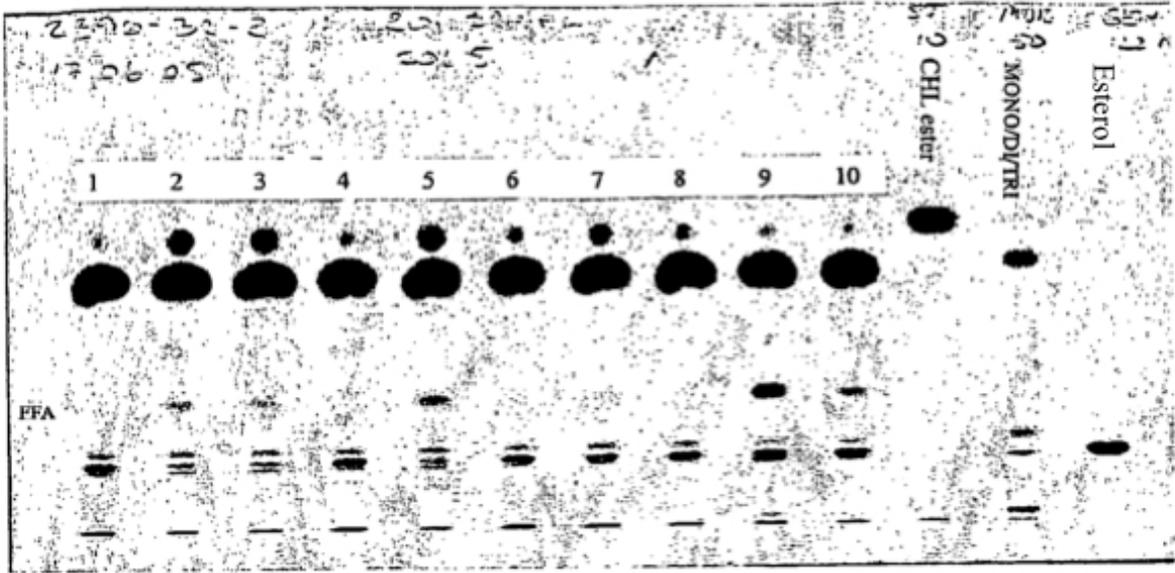


FIGURA 8

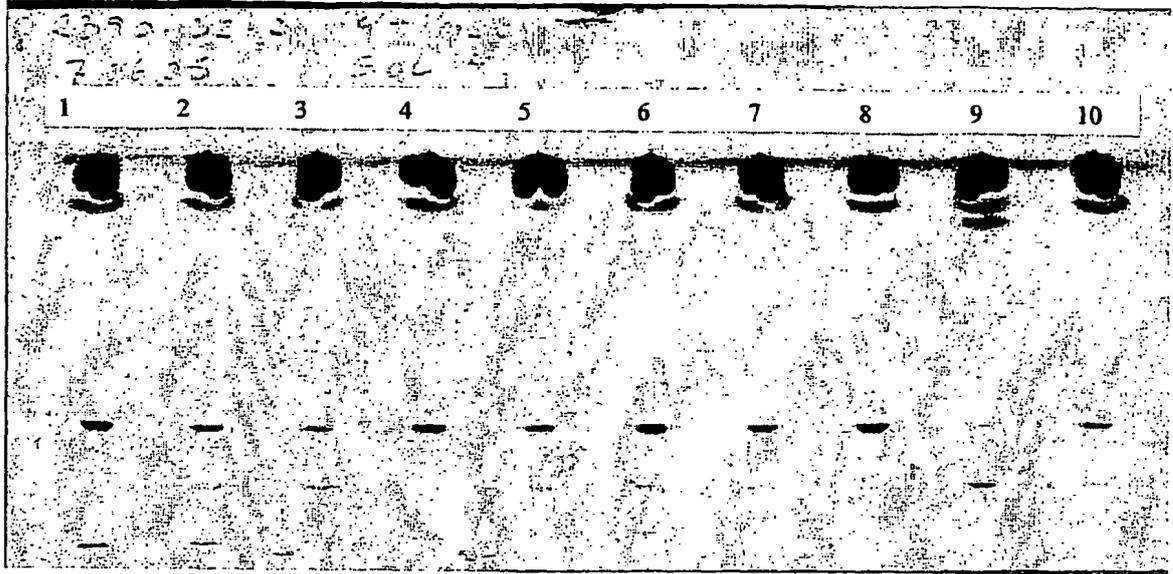


FIGURA 9

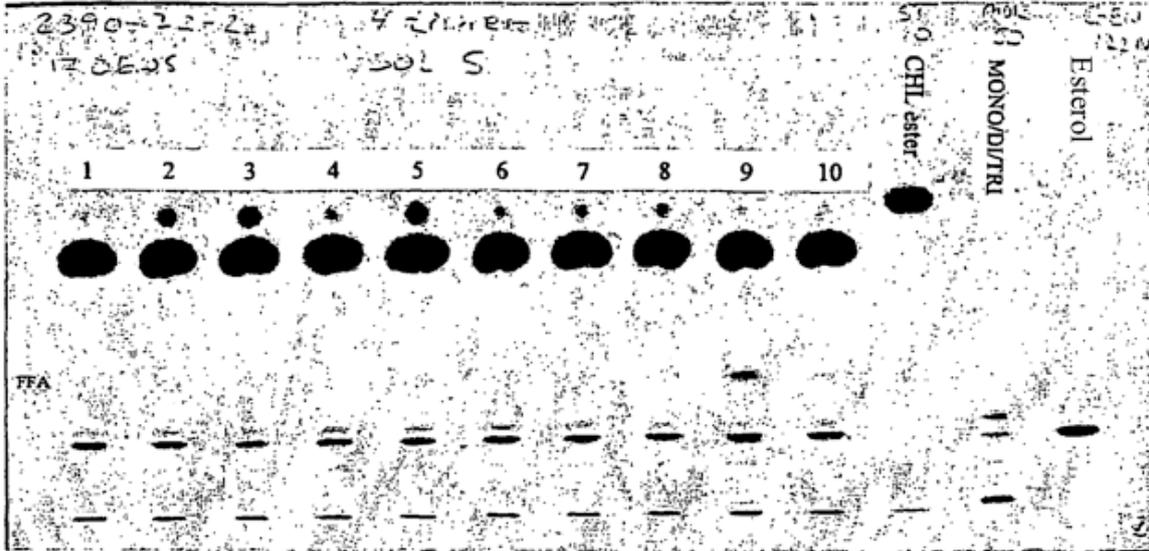


FIGURA 10

SEQ ID No. 16

```

1  ADTRPAFSRI VMFGDLSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT
61  IANAEGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLFNLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181 NKLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241 STDRQLSAFS PQRERLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301 SERAATFIET QYEFLAHG

```

FIGURA 11

(SEQ ID No. 1)

```

1  MKKWFVCLLG LVALTVQAAD SRPAFSRIVM FGDSLSDTGM MYSKMRGYLP
51  SSPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNPK
101 YQVINNLDYE VTQFLQKDSF KPDDLVLVW GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
151 DAISDAANRM VINGAKQILL FNLPDLGQNP SARSQKVEA VSHVSAYHNQ
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMA RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIANQY EFLAH*

```

FIGURA 12

(SEQ ID No. 2)

```

1  ivafGDStD geayygdsgd ggwgagladr ltallrlrar prgvdfnrg isGrtsdGrl
61  ivDalvallF laqslglpnl pPYLsgdflr GANFAsagAt Ilptsgpfil QvqFkdfksq
121 vlelrqalg1 lqellrlpv ldakspdlvt imiGtNDlit saffgpkste sdrnvsvpef
181 kdnlrqlikr Lrsnngarii vlitlvilnl gplGClPlkl alalassknv dasgclerln
241 eavadfneal relaiskled qlrkdglp dv kgadvpyvDl ysifqldgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNyrvcG naglcnvtak aCnpssylls flfwDgfHps ekGykavAea
361 1

```

FIGURA 13

(SEQ ID No. 3)

```

1  mkkwfvcllg lvaltvqaad srpafsrivm fgdslsdgtk myskmrgylyp sspyyegr
61  sngpvwleql tnefpgltia neaeggptav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlingakeill fnlpdlgqnp
181 sarsqkvea ashvsayhnq lllnlarqla ptgmvkifei dkqfaemlrp pqnfglsdgr
241 nacyggsyvw kpfarsast dsqlsafnpq erlaiagnpl laqavaspma arsastlnce
301 gkmfwdqvhp ttvvhalse paatfiesqy eflah

```

FIGURA 14

SEQ ID No. 4

```

1 mkkwfvcllg lialtvqaad trpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylp sspyyegrif
61 sngpvwleql tkqfpgltia neaeggatav aynkiswnpk yqvynldye vtqflqkdsf
121 kpddlivilw gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakqill fnlpdlggnp
181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlarqla ptgmwklfei dkqfaemlrd pqmfglsdve
241 npcydgggyw kpfatrsrst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspma rrsasplnce
301 gkmfwdqvhp ttvhaalse raatfietqy eflahg

```

FIGURA 15

SEQ ID No. 5

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadfra qypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggnndst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgypwitpat adpscflklp laagdvpylr aiqahldav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtr wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlqld

```

FIGURA 16

SEQ ID No. 6

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadfra qypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggnndst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgypwitpat adpscflklp laagdvpylr aiqahldav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtr wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlqld

```

FIGURA 17

SEQ ID No. 7

```

1 mdyekflifg dsitefafnt rpiedgkdqy algaalvney trkmdilqrg fkgytsrwal
61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagp qsvplpefid nirqmvslmk syhirpiiig
121 pglvdrekwe kekseeialg yftrnenfai ysdalaklan eekvpfvaln kafqeggda
181 wqqlitdqlh fsgkykifh dellkvietaf ypqyhpknmq yllkdwravl ddgsnims

```

FIGURA 18

(SEQ ID No. 8)

	10	20	30	40	50	60
	MNLRQWMGAA	TAALALGLAA	CGGGGTDQSG	NPNVAKVQRM	VVFGDSLSDI	GYTPVAQAV
70		80	90	100	110	120
	GGGKFTTNP	GIWAETVAAQ	LGVTLTPAVM	GYATSVQNCP	KAGCFDYAQG	GSRVTFPNGI
130		140	150	160	170	180
	GHNGGAGALT	YPVQQQLANF	YAASNNTFNG	NNDVVFVLAG	SNDIFFWTTA	AATSGSGVTP
190		200	210	220	230	240
	AIATAQVQQA	ATDLVGVKVD	MIAKGATQVY	VFNLPDSSLT	PDGVASGTTG	QALLHALVGT
250		260	270	280	290	300
	FNTTLQSGLA	GTSARIIDFN	AQLTAAIQNG	ASFGFANTSA	RACDATKINA	LVPSAGGSSL
310		320	330	340		
	FCSANTLVAS	GADQSYLFAD	GVHPTTAGHR	LIASNVLARL	LADNVAH	

FIGURA 19 (SEQ ID No. 9)

1 migsyvavgd sftegvdpg pdgafvgwad riaviladrr pegdfityni avgrildqi
 61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpgt dpdevaerfe lavaallaaa gtlvltgfd
 121 trgvpvikhI rgkiatyngh vraiadrygc pvidlwsirs vqdrrawdada rihlspgght
 181 rvalragqal glrvpadpdq pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rlrgeessgd
 241 hvtakgtlsp daikriaav a

FIGURA 20

(SEQ ID No. 10)

1 mqtncpaytsi vavgsfteg msdlipdgsy rgwadilat maarspgfry anlavrgkli
 61 gqvdeqvdv aaamgadvit lvgglndtir pkcdmarvrd litqaveria phceqvlmr
 121 spgrqgpvle rfrpmealr aviddiagrh gavvvdlyga qsladpmwd vdrhltaeg
 181 hrvaevawwq slghapedpe whapipatpp pgwvtrtad vrfarqhlp wigrftgrs
 241 sgdgipakrp dlipyedpar

FIGURA 21

(SEQ ID No. 11)

1 mtrgrdggag apptkhrall aavtlivai saaiyagasa ddgsrdhalq aggrtprgda
 61 apastgavvg awatapaaae pgtettglag rsvmvvhts vgggariti snlygqspit
 121 vthasialaa gpdaaaiaa tmrftfggs arviipaggq vmsdarlai pyganvltt
 181 yspipsgpvt yhpqarqtsy ladgdrtdav tavayttpt ywryltaldv lsheadgtv
 241 afgdsitdga rsgsdanhrw tdvlaarthe aagdgdrdtr ysvvnegisg nrllsrpgr
 301 padnpsglsr fqrdrvertn vkavvvvlgv ndvinspela drdailtgr tvdraharg
 361 lrvvgatitp fggygytea rebnrqevne eirsgvfdt vvdfdkalrd pydpmrds
 421 ydsghihpg dkyamrgav idlaalkgaa pvka

FIGURA 22 (SEQ ID No. 12)

1 mtmsrarva miaagaayg gggiglagaa avglvvaevq lamrvvgvt ptrvpnaqgl
 61 yggltptagd ppitmmngd staagqgvhr agqtpgalla sglavaerp vrigsvaqpg
 121 acsddldrv alvlaepdrv pdicvirmga ndvlhmpat rsvhlssav rritagaev
 181 vvgtpdigt iervrqlrw lamarsqla aatigaveq ggrtvsldl lgpfaqnpr
 241 elfgpdnyhp saegyataam avlpsvcaal giwpadeehp dalregflp varaaaeas
 301 eagtevaam ptgprgpwal lkrrmvs eaepsspsgv

FIGURA 23 (SEQ ID No. 13)

1 mgrgdqrtr ygrrarval aaltaavlgv gvagcdsvgg dspapsgsps krtrtapawd
 61 tspasvaavg dsitrgfdac avlsdcpevs watgssakvd slavrllgka daaehswnya
 121 vtgamadit aqvtraaqre pelvavmaga ndacrstsa mtpvadfraa feeamatlrk
 181 ktpkaqvys sipdikrws qgrtnpigkq vwkigicpsm lgdadsidsa atirmtvrd
 241 rvadynevlr evcakdrrc sddgavhefr fgtdqishwd wfhpvsdggq rlaeiayrav
 301 laknp

FIGURA 24 (SEQ ID No. 14)

1 mrlsraata sallltpala ifgasaavsa priqatdyva lgdsyssvgv agsydsssgs
 61 ckrstksypa lwaashgtr fnftacsgr tgdlakqit pvnsqtdivs itiggndagf
 121 adtmittcnlq gesaclaria karayiqqtl paqldqvyda idsrapaaqv vvlgyprfyk
 181 lggscavgls eksraainaa addinavtak raadhgfafg dvnttfaghe lcsgapwlhs
 241 vtipvensyh ptangqskgy lpvinsat

FIGURA 25 (SEQ ID No. 15)

1 MKKWFVCLLG LIALTVQAAD TRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
 51 SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNPK
 101 YQVINNL DYE VTQFLQKDSF KPDDLVLWV GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
 151 DAISDAANRM VLNGAKQILL FNLPLDGNP SARSQKVEA VSHVSAYHNK
 201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
 251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMA RRSASPLNCE
 301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIETQY EFLAHG*

FIGURA 26

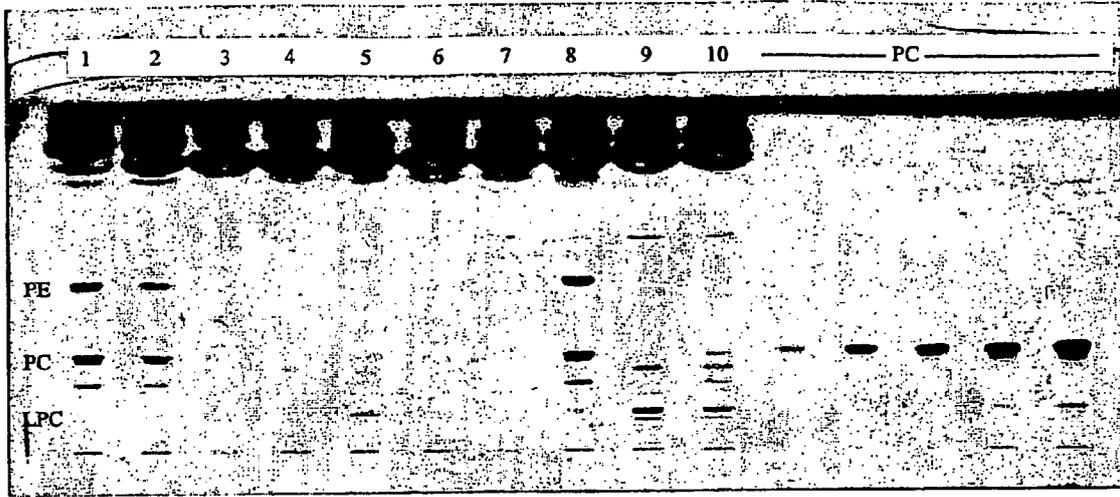


FIGURA 27

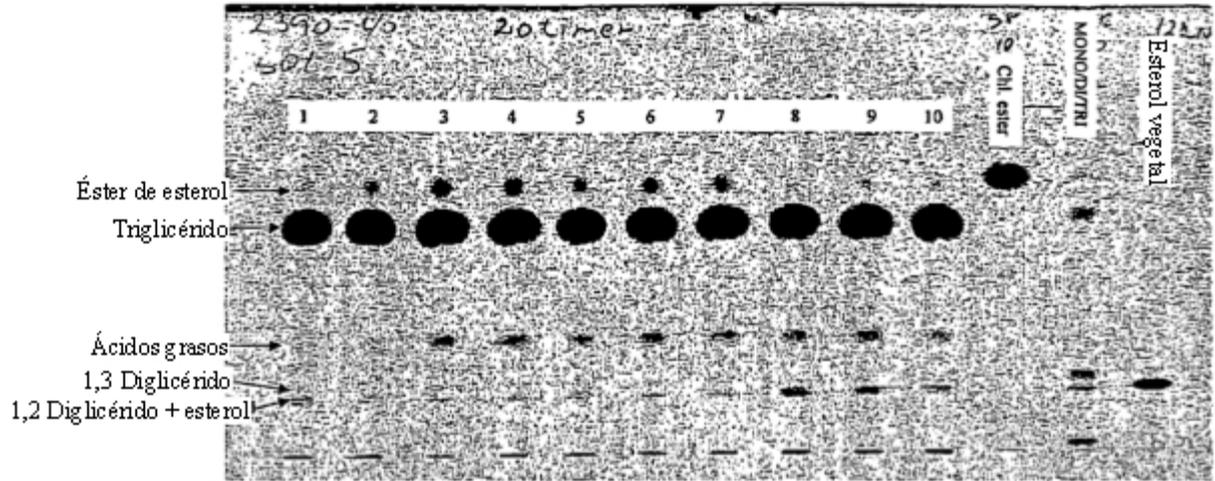


FIGURA 28 (SEQ ID n.º 17)

```

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

Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu
355          360          365
Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu
370          375          380
Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe
385          390          395          400
Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser
405          410          415
Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
420          425          430
Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
435          440          445
Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
450          455          460

Phe
465

```

FIGURA 29 (SEQ ID n.º 18)

```

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

Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro
340          345          350
Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu
355          360          365
Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu
370          375          380
Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe
385          390          395          400
Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser
405          410          415
Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
420          425          430
Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
435          440          445
Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
450          455          460
Phe His His His His His His
465          470

```


FIGURA 31

(SEQ ID No. 19)

1 migsyvavgd sftegvdpq pdgafvgwad riavladr pegditytni avrgltdqi
61 vaeqvprvg lapdivsfaa ggndiirpqt dpdevaerfe lavaalaaa gtlvttgfd
121 trgvpvikhl rgkiatyngh vraiadrygc pvtidiwslrs vqdrzawdad rhlispeght
181 rvalragqal glrvpadpdq pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rirgessgd
241 hvtakgtisp daiktriaav a

FIGURA 32

(SEQ ID No. 25)

```

  1  MFKFKKNFLV  GLSAALMSIS  LFSATASAAS  ADSRPAFSRI  VMFGDSLSDT
 51  GKMYSKMRGY  LPSSPPYYEG  RFSNGPVWLE  QLTKQFPGLT  IANAEGGAT
101  AVAYNKISWN  PKYQVINNLD  YEVTQFLQKD  SFKPDDLVL  WVGANDYLAY
151  GWNTEQDAKR  VRDAISDAAN  RMVLNGAKQI  LLFNLPDLGQ  NPSARSQKVV
201  EAVSHVSAYH  NQLLLNLARQ  LAPTMVKLF  EIDKQFAEML  RDPQNFGLSD
251  VENPCYDGGY  VWKPFATRSV  STRQLSAFS  PQERLAIAGN  PLLAQAVASP
301  MARRSASPLN  CEGKMEWDQV  HPTTVVHAAL  SERAATFIAN  QYEFLAH**

```

FIGURA 33

(SEQ ID NO. 26)

```

MRLTRLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSITIGGNDAGFADAMIT
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

```

FIGURA 34

SEQ ID No. 27

ZP 00058717

1 mlphpagerg evgaffallv gtpqdrirl echetprlg rcgcgerrvp pltlpgdgv
 61 ctsstrdae tvwrkhlqpr pdggfrphlg vccllagqgs pgvlwcgreg crfevcrdt
 121 pglstrngd sspfragws lppkcgeisq sarkpavpr ysllrdrpd gprgrfvsg
 181 praatrrlf lgipalvlt altvlavpt gretlwrnwc eatqdwclgv pvdsrgqpa
 241 dgefillspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwrana ypelvacayd
 301 faghlsflac sgqrgyamld aidevsgld wnsptsstvt igiggnldgf stvlktcmv
 361 vplldskact dqedairkm akfettfeel isevrtrapd arilvgypr ifpeptgay
 421 yltasnqrw lnetiqefnq qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
 481 pwnvgqlrd latgvtvdrs tthpnaaghr avgervieqi etgperplya tfavvagatv
 541 dtlagevg

FIGURA 35

(SEQ ID No. 28)

1 mgsgpraatr rrlfigipal vltaltvl avptgretlw rnwceatqdw clgvpvdsrg
 61 qpaedgefil lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgadyyp gtavkggcwr sanaypelva
 121 eaydfaghls flacsgrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlqfstvikt
 181 cmvrvpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep
 241 tgayytilas nqrwlnetiq cfnqqlaeav avhdeciaas ggvgsvfvd vyhaldghei
 301 gsdepwngv qlrdlatgvt vdrsthpna aghravgerv iequietpgr plyatfavva
 361 gatvdtlage vg

FIGURA 36

(SEQ ID No. 29)

1 mrttviaasa lllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyalgdsya
 61 amggrdqplr gepfclrsg nypellhaev tdlcagavt gdllprtig ertlpaqvda
 121 ltedtlvtl siggnldfg evagcireri agenaddcvd llgetigeql dqlppqldrv
 181 beairdragd aqvvtgylp lvsagdcpep gdvseadrrw aveltgqine tvreaaerhd
 241 alfvlpddad ehtscappq rwadiqqqt dayplhpts gheamaavr dalglepvqp

FIGURA 37

(SEQ ID No. 30)

ZP 00094165

1 mgqvklfarr capvllalag lapaatvare aplaegaryv algssfaagp gvgpnapgsp
 61 ercgrgtlly phllaealki dlvdacsga tthbvlgpwn evppqidsvn gdtrlvlti
 121 ggndvsfvgn ifaaacekma spdprcgkwr eiteewqad eermrsivrq iharaplary
 181 vvdvityvlp psgtcaamai spdrlaqsr aakrlarita rvareegasl lkfshisrth
 241 hpcsakpwn glsapaddgi pvhpnrigha eaaaalvklv klmk //

FIGURA 38

SEQ ID No. 31

NP 625998

1 mrrfrlvglf sslvlaagaa ltgaataqaa qpaaadyva lgdsyssvgv agsyissgd
 61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgar tgdvlsqqlg plssgtglvs isiggnadagf
 121 adtmntcvlq sessclsria taeyvdstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigyprfyk
 181 lgttciglse iktainkas dhlntvlaqr aaahgftfgd vrtftghel csgspwihsv
 241 nwnlgesyvh ptaagqseggy lplvngaa
 //

FIGURA 39

SEQ ID No. 32

NP 827753

1 mrrsritayv tsllavgca ltgaataqas paaatgyva lgdsyssvgv agsysssgd
 61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvlnqlg tlnsstglvs ltiggnadagf
 121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta iskapsahv avlgyprfyk
 181 lggsclagls etkrsainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icssstwlhs
 241 ldlbnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva
 //

FIGURA 40

SEQ ID No. 33

MRLTRLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
 NAYPARWAAANAPSSFTAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSITIGGNDAGFADAMTT
 CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC
 LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
 SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

FIGURA 41



FIGURA 42

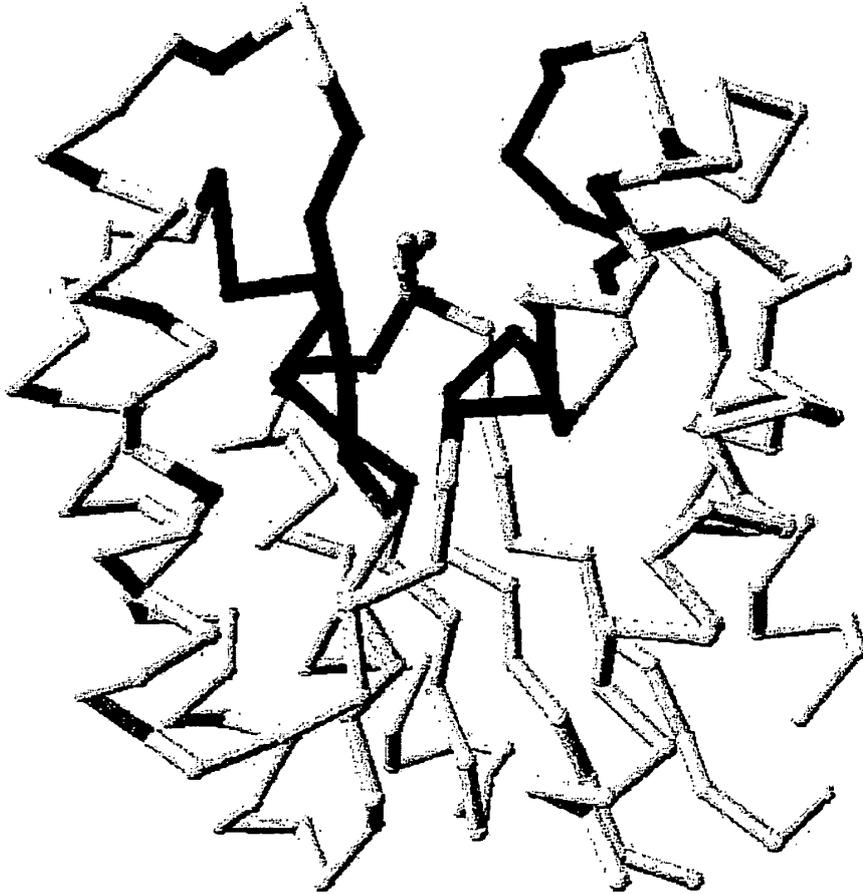


FIGURA 44

(SEQ ID No. 34)

ADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGRFSNGPVWLEQLTNEFPGL
 LTIANEAEGGPTAVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYL
 AYGWNTAQDAKRVRDAISDAANRMVLNGAKEILLFNLPDLGQNPASARSQKVEAASHV
 SAYHNQLLLNLARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDQRNACYGGSYVWKP
 FASRSASTDSQLSAFNPQERLAIAGNPLLAQAVASPMMAARSASTLNCE
 GKMFWDQVHPTTVVHAALSEPAATFIESQYEFLLAH

FIGURA 45

(SEQ ID No. 35)

1	ADTRPAFSRI	VMFGDSLSDT	GKMYSKMRGY	LPSSPPYYEG	RFSNGPVWLE	QLTKQFPGLT
61	IANEAEGGAT	AVAYNKISWN	PKYQVINNLD	YEVTVQFLQK	SFKPDDLVL	WVGANDYLAY
121	GWNTAQDAKR	VRDAISDAAN	RMVLNGAKQI	LLFNLPDLGQ	NPSARSQKVV	EAVSHVSAYH
181	NKLLLNLARQ	LAPTGMVKLF	EIDKQFAEML	RDPQNFGLSD	VENPCYDGGY	VWKPFAATRSV
241	STDRQLSAFS	PQERLAIAGN	PLLAQAVASP	MARRSASPLN	CEGKMFWDQV	HPTTVVHAAL
301	SERAATFIET	QYEFLLAHG				

FIGURA 46

(SEQ ID No. 36)

ACAGGCCGATGCACGGAACCGTACCTTTCCGCAGTGAAGCGCTCTCCCCCATCGTTCGC
 CGGGACTTCATCCGCGATTTTGGCATGAACACTTCCTTCAACGCGCGTAGCTTGCTACAA
 GTGCGGCAGCAGACCCGCTCGTTGGAGGCTCAGTGAGATTGACCCGATCCCTGTCGGCCG
 CATCCGTCATCGTCTTCGCCCTGCTGCTCGCGCTGCTGGGCATCAGCCCGGCCAGGCAG
 CCGGCCCGGCCTATGTGGCCCTGGGGGATTCTATTCTCGGGCAACGGCGCCGGAAGTT
 ACATCGATTGAGCGGTGACTGTCACCGCAGCAACAACGCGTACCCCGCCCGCTGGGCGG
 CGGCCAACGCACCGTCCTCCTTCACTTCGCGGCCTGCTCGGGAGCGGTGACCACGGATG
 TGATCAACAATCAGCTGGGCGCCCTCAACGCGTCCACCGGCCTGGTGAGCATCACCATCG
 GCGGCAATGACGCGGGCTTCGCGGACGCGATGACCACCTGCGTCAACAGCTCGGACAGCA
 CCTGCCTCAACCGGCTGGCCACCGCCACCAACTACATCAACACCACCCTGCTCGCCCGGC
 TCGACGCGGTCTACAGCCAGATCAAGGCCCGTGCCCCAACGCCCGCGTGGTCGTCCTCG
 GCTACCCGCGCATGTACCTGGCCTCGAACCCCTGGTACTGCCTGGGCCTGAGCAACACCA
 AGCGCGCGGCCATCAACACCACCGCCGACACCCTCAACTCGGTGATCTCCTCCCGGGCCA
 CCGCCACGGATTCCGATTCCGGCGATGTCCGCCCGACCTTCAACAACCACGAACTGTTCT
 TCGGCAACGACTGGCTGCACTCACTCACCTGCCGGTGTGGGAGTCGTACCACCCACCA
 GCACGGGCCATCAGAGCGGCTATCTGCCGGTCTCAACGCCAACAGCTCGACCTGATCAA
 CGCACGGCCGTGCCCGCCCCGCGGTCACGCTCGGCGCGGGCGCCGAGCGCGTTGATCA
 GCCACAGTGCCGGTGACGGTCCCACCGTCACGGTCGAGGGTGTACGTACGGTGGCGCC
 GCTCCAGAAGTGAACGTGAGCAGGACCGTGGAGCCGTCCTGACCTCGTGAAGAACTC
 CGGGGTGAGCGTGATCACCCCTCCCCGTAGCCGGGGGCGAAGGCGGCGCCGAACCTCCTT
 GTAGGACGTCCAGTCGTGCGGCCCGGCGTTGCCACCGTCCGCGTAGACCGCTCCATGGT
 CGCCAGCCGGTCCCCGCGGAACCTCGGTGGGGATGTCCGTGCCAAGGTGGTCCCGGTGGT
 GTCCGAGAGCACCGGGGGCTCGTACCGGATGATGTGCAGATCCAAAGAATT

FIGURA 47

(SEQ ID NO. 37):

MRLTRLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
 NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSITIGGNDAGFADAMTT
 CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVWVLYPRMYLASNPWYC
 LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
 SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

FIGURA 48

SEQ ID No. 38

1 miphpagerg evgaffallv gtpqdriri echetrplrg rcgcgerrvp pltipgdgvi
61 ctsstrdae twrkhlpqr pdggfrphlg vgcilagggs pglwccgreg crfevcrdt
121 pglstrmgd ssppfragws lppkgeisq sarktpavpr yslirtdrpd gprgrfvgs
181 praatrrif lgipalvlt altivlavpt grethwmwc eatqdwclgv pvdsrgqpae
241 dgefillspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwsana ypelvaeayd
301 faghlsflac sgqrgyamld aidevgsqld wnsphtslvt igiggndlgf stvktcmvr
361 vpildskact dqedairkm akfettfeel isevtrapd arilvgypr ifpeeptgay
421 yltasnqrw lnetiqefnq qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
481 pwwngvqlrd latgvtvdrs tthpnaaghr avgervieqi etgpgprlya tfavvagatv
541 dtlagevg

FIGURA 49

(SEQ ID No. 39)

1 ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcggc gtgggcgtcc aggtgcaggt gcaggttctt
 61 caactgctcc agcaggatgc cgccgtggcc gtgcacgatg gccttgggca ggcctgtggt
 121 ccccgacgag tacagcaccc atagcggatg gtcgaacggc agcgggggtga actccagttc
 181 cgcgcttcg ccccgggctt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga cagggccgca
 241 gccaggtac ggcaggacga cgggtgtgctg caggctgggc atgccgtcgc gcagggcttt
 301 gagcacgtca cggcggtcga agtccctacc gccgtagcgg tagccgtcca cggccagcag
 361 cactttcggg tcatctcgc cgaaccggtc gaggacgctg cgcaccccca agtcggggga
 421 acaggacgac caggctgcac cgtcgcggc gcaggcgagg aatgcggccg tcgcctcggc
 481 gatgttcggc aggtaggcca cgaccggtc gccggggccc accccgaggc tgcggagggc
 541 cgcagcgtc gccggcggc ggtcccgag ttctcccag gtccactcg tcaacggccc
 601 gagttcggac gcgtccgga tcgccacggc tgatgggtca cggtcgcca agatgtgctc
 661 ggcgtagttg aggggtggc cggggaacca gacggcggc ggcatggcgt cggaggcga
 721 cactgtggtg tacggggg cggcgcgc cggtagtac tccagatcg cggaccagaa
 781 tcttcgagg tcggtaccg accagccca cagtgcctc tagtccggtg cgtccacacc
 841 gcggtgctcc cgcaccagc ggtgaacgc ggtgaggtg gcgcttctt tgcctcctc
 901 gtcgggactc cacaggatcg gcgctcggc cttgagtgc atgaaacgc acccctcgt
 961 ggacgggtcg gatcgggtga gcgtcgggt cctcccctaa cgctcccgg taccggagt
 1021 ttgtcacca catctagc gcgggacgc gaaaccgtat ggagaaaaca cctacaaccc
 1081 cggccggacg gtgggttcg gccacacta ggggtcgggt gcctgctgc cggcagggc
 1141 agtcccggg tctgtggtg cgggcccgg ggctgtcgt tcgaggtgt cggcgggac
 1201 actccgggc tcagccgtac ccgcaacggg gacagtctc ctccctccg gctgtgatg
 1261 tccctccc cgaatgctg cgagatctc cagtacgcc ggaaaacacc cgtgtgccc
 1321 agtactctt gtctcgaac agacaggccg gacgtccac gggggagggt tfgggcagc
 1381 ggaccacgtg cggcgaccg acgacgggt ttctcggta tcccgcctt tgtactgtg
 1441 acagcgtca cgtggtctt ggctgtccg acggggcgc agacgctgt gcgcatgtg
 1501 tgtaggcca cccaggactg gtgctgggg gtgccggtc actcccggc acagcctgc
 1561 gaggacggc agttctgct gcttctccg gtccaggcag cgactgggg gaactattc
 1621 gcgtcgggg attcgtactc ttcgggggac ggggcccgc actactatc cggcaccgc
 1681 gtaagggcg gttgctggc gtccgtaac gcctatccg agctgtgct cgaagcctac
 1741 gacttcggc gacactgtc gttctggcc tcagcggcc agcgcggta cggcatgct
 1801 acgatcggg acgaggtcg ctgcagctg gactggaact cccctcacac gtcgtggtg
 1861 acgatcggg acgaggtcg ctgcagctg gactggaact cccctcacac gtcgtggtg
 1921 cgggtgccc tctggtgac caaggcgtg acggaccag aggacgtat ccgcaagcg
 1981 atggcgaaat tcgagacgac gttgaagag ctcatcagc aagtgcgcac ccgcgccg
 2041 gacgcccga tctgtgctt gggctaccc cggattttc cggaggaacc gaccggcgc
 2101 tactacacgc tgaccgag caaccagcg tggctcaac aaaccattca ggagtcaac
 2161 cagcagctc cggaggctg cgcgtccac gacgaggaga ttccgcgtc gggcggggt
 2221 ggcagcgtg agttcgtga cgtctaccac gcgtggacg gccacgagat cggctcggc
 2281 gagccgtgg tgaacgggt gcagttcgg gacctgcca cgggggtgac tgtggaccg
 2341 agtacctcc accccaacgc cgtgggac cgggcgtcgt gtagcgggt catcgagcag
 2401 atcgaaaccg gcccgggcc tccgctctat gccacttcc cgggtggtg gggggcgacc
 2461 gtggacactc tcgcgggcga ggtgggtga cccggctac cgtccggccc gcaggtcgc
 2521 gagactcgc gcgatcgtt cactgccc gtgcagttc tctcggta tgaccagcg
 2581 cggggagagc cggatcgtt agccgtcgt gctttgacg agcacacccc gctcaggag
 2641 ccgtcgcac agttctctc cgtggccag agtcgggtc acgtgatcc cagcccacg
 2701 gccgatcgt cgggcccga ccacgccgt gccaccagt tggctgaggc gggcgcgag
 2761 cacggggcg agggcggga catgtccag gtaagggcg tcgaggacga ggctaccac
 2821 ggcagtcgg accgcgag cgagggcgt gccgccaag gtctgcccgt gctggccgg
 2881 gcggtacgc tcgaagact ccgctcgc taccgccc gccacggga ggtatccgc
 2941 gccagcgtc ttccgaaca ggtagatc ggcgtcact ccgtgtgtg cgcaggccc

FIGURA 50

(SEQ ID No. 40)

1 vsggpraatr rrifigipal vivtaltivi avptgretlw rmwceatqdw cigvpvdsrg
61 qpaedgefill ispvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlgfstvlkt
181 cmvrvplids kactdqedai rkmakfett feelisevrt rapdarilv gyprifpeep
241 tgayytitas nqrwinetiq efnqqiaeav avhdeeiaas ggvgsvfvd vyhaldghei
301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerf ieqietgpgr plyatfavva
361 gatvdtlage vg

FIGURA 51

(SEQ ID No. 41)

1 mrttviaasa llllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyalgdsya
61 amggrdqplr gepfcirssg nypellhaev tdltcggavt gdllleptlg ertipaqvda
121 ltedttivi siggndlgfg evagcileri agenaddcvd lletigeql dqlppqldr
181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpep gdvseadrw aveltgqine tvreaaerhd
241 alfvipddad ehtscappqq rwadiqqqqt dayplhptsa gheamaaavr dalglepvqp

FIGURA 52

(SEQ ID No. 42)

1 ttctggggtg ttatggggtt gttatcggct cgtcctgggt ggatcccgcc aggtggggtg
 61 ttcacggggg actttgtgt ccaacagccg agaatgagtg ccctgagcgg tgggaatgag
 121 gtgggcgggg ctgtgtcgcc atgagggggc ggcgggctct gtggtgcccc gcgacccccg
 181 gccccgtga gcggtgaatg aaatccggct gtaatcagca tcccgtgccc acccgcgcg
 241 ggaggtcagc gcccgagtg tctacgagc cggatcctct cggactcggc catgctgtcg
 301 gcagcatcgc gctcccgggt ctggcgctcc ctggctgtt ctgctgctg tccctggaag
 361 gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat cccggatgcc cacttcggcg
 421 ccatccggca atccgggag ctccgggtg aagtaggtg catccgatgc gtcggtgagc
 481 ccatagtggg cgaagatctc atcctgctcg aggggtctca ggccactctc cggatcgata
 541 tggggggcgt ccttgatggc gtcctgctg aaaccgaggt gcagcttggt ggcttcaat
 601 ttcgaccac ggagcgggac gaggctgga tgacggccga agagcccgtg glggacctca
 661 acgaagggtg gtagtcccg gtcatttg aggaacacgc cctccaccgc acccagctg
 721 tggccgagtg tctgtaggc gctggcatcc agaagggaaa cgatctcata ttgtcgggtg
 781 tgctcagaca tgatctctt ttgctgctg ttctgtgac taccacggtg gggctgaatg
 841 caactgtat tttctgta tttaggaat tggccatat cccacagggt ggctgtggtc
 901 aaatcgtcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtg tgggagccct ggtcgcggtt
 961 ccgtgggagg cgcctgccc cgcaggatcg tggcatcgg cggatctggc cgttaccg
 1021 cgtgaataa aatcattctg taacctcat cacggttgg ttaggtatc cgtcccttc
 1081 gtctgacc cgtccccggc gcgcgggagc ccgcggttg cggtagacag gggagacgtg
 1141 gacaccatga ggacaacggt catcgcagca agcgcattac tcttctcgc cggatgcg
 1201 gatggggccc gggaggagac cgcgggtgca ccgcccgggt agtctcccg gggcatccg
 1261 gaggaggggg cggaggcgtc gacaagcatc accgacgtct acatgccct cggggattcc
 1321 tatcggcga tgggcccggc ggatcagccg ttaccgggtg agccgttct cctgcgctc
 1381 tccgtaatt acccgaact cctccacgca gaggcaccg atctcacctg ccagggggcg
 1441 gtgaccggg atctgtcga acccaggag ctgggggagc gcacgctgc ggcgagggtg
 1501 gatcgcgta cggaggacac caccctggtc accctctca tgggggcaa tgacctcga
 1561 ttcggggagg tggcgggat catccgggaa cggatcggc gggagaacgc tgatgatgc
 1621 gtggacctgc tgggggaaac catcggggag cagctcagc agctcccc gcagctggac
 1681 cgcgtgcagc aggtatccg ggaccgccc ggggacgccc aggtgtgtt caccggtac
 1741 ctgcccctg tctgtccg ggactgccc gaactgggg atgtctcga ggcggatcgt
 1801 cgtgggccc ttgagctgac cgggagatc aacgagacc tgccgaggg gccgaacga
 1861 cacgatgcc tcttgtct gcccgacgat gccgatgagc acaccagtg tgcacccca
 1921 cagcagcgt gggcgggat ccagggcaa cagaccgat cctatccgt gcacccgacc
 1981 tccgcccggc atgaggcgt ggcccccgc gtcgggagc cgtgggctt ggaaccggtc
 2041 cagccgtagc gccggcgcg cgtgtgca cgaccaacc atgccaggct cagtcacat
 2101 ccgcacatag cgcgcgagg cgtgggag cgcacatag aggatgagcc cgtgcccag
 2161 gatgatgagc agcacctgc cgaagggtg tccccgagg gtgcgagag ccgagtcag
 2221 acctcggcc tgcctcggat catgggcca accgagatg acgatcaaca ccccaggat
 2281 cccgaaggcg ataccacgg cgacataacc ggcgttccg gtgatgatga tgcgggtcc
 2341 gacctgccct gacccgcac ccgctccag atcctcccg aaatcccgg tggccccctt
 2401 ccagagggtg tagacaccg ccccagtac caccagccc gcgaccaca ccagaccac
 2461 acccagggt tggatagga cgggtgggt gacatcgtg cgggtctcc catcggaggt
 2521 gctgccccc cgggcaagg tggagggtt caccgcccagg gagaagtaga ccatggccat
 2581 gaccgcccc ttggccctt cctgaggct ctgcccgc agcagctggc tcaattgca
 2641 gagtcccagg gccgcccagg cgtgacggc aaccacagg aggaactgcc caccgggagc
 2701 ctccgcatg gtggccagg caccigaat cgaggcctca tcaccgaac cgcgggatcc
 2761 agtggcgtg cgcaccgca tccaccgat gaggatgtg agtatgcca ggacaatgaa
 2821 accacctct gccagggtg tgcgcccgg gtgtctctg gctggtcgg cagcccgtc
 2881 gatcgtcct ttcgcccagc tgggtcggc ctatccata gctccattg aaccgcttg
 2941 aggggtggc ggccactgc agggcggat gtgatcga ctgtgatgt ccatcaacc

FIGURA 53

(SEQ ID No. 43)

1 mrrfrivgfl sslvlaagaa ltaataqaa qpaaadgyva lgdsyssvgv agsyisssgd
 61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgr tgdlvsqqlg plssgtglvs isiggnndagf
 121 admtttcvlq sessclsria taeayvdstl pgkldgvysa isdkapnavh vvigyprfyk
 181 lgttciglse tkrtainkas dhlnlvlaqr aaahgftfgd vrtftghel csgspwlhsv
 241 nwnlignesyh ptaagqsggy lpvlingaa

FIGURA 54

(SEQ ID No. 44)

1 cccggcggcc cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcgggctg cgtcttcac
 61 aggcctcca tcgctcggc gaccggcgc gtgtagtgg cccggaccic gtcccagggt
 121 cccgcggcga tctggcgggt ggtgcgggtc gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag
 181 cccatcgtca cgtctccgg ctgcgggtcg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgcctcg
 241 ccgagcacct tctcggcgag gtcggcgctg gtcgccgta ccgtgacgtc ggcgccccgg
 301 ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tcgccctccg ccagcgtcgc gctcgggtcg
 361 tcgtcgcggg cgatccgcag cagcgcgcgc cccggcggca gcagcgtggc gccggaccgt
 421 acgcggtcga tgttcgccg gtgcgagtac ggctgtcac ccgtggcga acgcccggag
 481 aacagcgcgt cgacgacgtc ggacggggag tcgctgtcgt ccacgtgag ccggtcggc
 541 agggcttctg gcgggtcac ggacatgtc ccatgatcgg gcacccggcc gccgcgtgca
 601 cccgcttcc cgggcacgca cgacaggggc ttctcgcgc tctccgtcc gaactgaac
 661 gagtgcagc ctttctgg catggacact tccagtcaac gcgcgtagct gctaccacgg
 721 ttgtggcagc aatcctgta agggaggctc catgagacgt tccgacttg tcggcttct
 781 gagtgcgtc gtctcgcgc cggcgcgc cctcaccggg gcagcagacc cccaggcggc
 841 ccaacccgcc gccgcgcgc gctatgtgg cctcggcgac tctactctc cgggggtcgg
 901 agcgggcagc tacatcagct cgagcggcga ctgcaagcgc agcacgaagg cccatcccta
 961 cctgtgggcg gccgccact cgcctccac gttcagctc accgcctgtt cggcgcggc
 1021 tacgggtgat gttctctcg gacagctcg cccgctcagc tccggcaccg gcctcgtctc
 1081 gatcagcacc ggcggcaacg acgcccgtt cgcgcacacc atgacgacct gtgtgtcca
 1141 gtccgagagc tctgcctgt cgcggatcgc caccgccgag gcgtacgtc actcagcgt
 1201 gcccggaag ctgacggcg tctactcggc aatcagcgc aaggcggcga acgcccacgt
 1261 cgtcgtcacc ggtaccgc gcttctaca gctcggcacc acctgcatc gctgtccga
 1321 gaccaagcgg acggcgatca acaaggcctc cgaccacctc aacaccgtcc tcgccagcg
 1381 cgcgcggcc cagggctca cctcggcga cgtacgcacc acctcaccg gccacgagct
 1441 gtgctccggc agcccctggc tgcacagcgt caactggctg aacatcggcg agtctacca
 1501 cccaccgcg gccggccagt ccggtggcta cctcgggtc ctcaacggcg ccgctgacc
 1561 tcaggcggaa ggagaagaag aaggagcggg gggagacgag gagtgggagg ccccgcccga
 1621 cgggttccc gtcccgtct ccgtctcgt cccgggtccc caagtcaccg agaacgccac
 1681 cgcgtcggac gtggcccga ccggactccg cacctccacg cgcacggcac tctcgaacgc
 1741 gccggtgtc tcgtgcgtc tcaccaccac gccgtcctgg cgcgagcgt cgcgcccga
 1801 cgggaaggac agcgtccgcc accccggatc ggagaccgac ccgtccgcgg tcaccaccg
 1861 gtggccgacc tccgcccga gcccccgc cgtgaacgtc gccgtgaacg ccggtgcccg
 1921 gctgtcggc gccggacag ccccgagta gtgggtcgc gagcccacca ccgtcacctc
 1981 caccgactc gctcggggc

FIGURA 55

(SEQ ID No. 45)

1 mrsritayv tslllavgca ltgaataqas paaaatgyva lgdsyssvgv agsylsssgd
 61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvianqlg tinsstglvs liggndagf
 121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk
 181 lggscлагs etkrainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icssstwlhs
 241 idllnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva

FIGURA 56

SEQ ID No. 46

1 ccaccgccgg gtcggcggcg agtctctgg cctcggtcgc ggagagggtg gccgtgtagc
 61 cgttcagcgc ggcgccgaac gtctcttca ccgtgccgc gtactcgttg atcaggccct
 121 tgccctgtct cgacgcggcc tgaagccgg tgcccttct gagcgtgacg atgtagctg
 181 cctgatcgc ggtgggggag ccggcggcga gcaccgtgcc ctccggcggg gtggcctggg
 241 cgggcagtgc ggtgaatccg cccacgaggg cgccggtcgc cacggcgggt atcgcggcga
 301 tccggatctt ctgtctacgc agctgtgcca tacgagggag tctcctctg gccagcggcg
 361 cgctgggtg gggcgcacgg ctgtggggg tgcgcgctc atcacgcaca cggccctgga
 421 gcgtcgtgtt ccgccctggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggctcaaggg
 481 agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggcgg tgagcaccoc
 541 gggcgcacc ccgaaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttctctg aacacgcgta
 601 gctggtacga cggttacggc agagatctg ctaaagggag gttccatgag acgttccga
 661 attacgcat acgtgacctc actcctctc gccgtcggct gcgcctcac cggggcagcg
 721 acggcgcagg cgtccccagc cggcgcggcc acgggctatg tggccctcg cgactcgtac
 781 tegtccgggt tggcgcggcg cagctacctc agctccagcg gcgactgcaa gcgcagttcg
 841 aaggcctatc cgtacctctg gcaggccggc cattcacctc cgtcgtttag ttcatggct
 901 tgctcggcg ctcgtacggg tgatgtcctg gccaatcagc tggcaccct gaactcgtcc
 961 accggcctgg tctccctcac catcggaggc aacgacggcg gcttccga cgtcatgacg
 1021 acctgtgtc tccagtcca cagcgcctgc ctctccgca tcaacacggc gaaggcgtac
 1081 gtcgactcca cctgcccgg ccaactcgac agcgtgtaca cggcgtatcag cacgaaggcc
 1141 ccgtcggccc atgtggcgt gctgggctac cccgcttct acaaactggg cggctcctgc
 1201 ctgcgggccc tctcggagac caagcggctc gccatcaacg acgcggccga ctatctgaac
 1261 agcggcatcg ccaagcgcgc cggcaccac ggcttacct tggcgcagct caagagcacc
 1321 ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagtctga cctgctgaac
 1381 atcggccagt cctaccacc gaccgcgcc ggccagtccg gcggctatct gccggtcatg
 1441 aacagcgtgg cctgagctcc cacggcctga attttaagg cctgaattt taaggcgaag
 1501 gtgaaccgga agcggaggcc ccgtccgtcg gggctcctg cgcacaggtc accgagaacg
 1561 gcacggagtt ggacgtcgtg cgcaccgggt cgcgcacctc gacggcgtac tegtctgaga
 1621 tegtccgtc cgtgtcgtac gtgtgacga acacctgct ctgtgggtc ttccgcgc
 1681 tgcggggaa ggacagcgtc ttccagccc gatccgggac ctgcacctc ttggtcacc
 1741 agcggctact cacctcgacc ggcaccggc ccaccgtgaa ggtcggcgtg aacgtggcg
 1801 cctggcgggt gggcggcggg caggcaccgg agtagtcgtg gtgcacggcg gtgaccgtca
 1861 ccttaccgga ctggcggcg ggggtcgtc taccggccg gccaccggc cctccgggag
 1921 tggagcccga cgtgtggtc cccccggcgt cggcgtgtc gtctcgggg gtttccaac

FIGURA 57

SEQ ID No. 47

1 mgsppraatr rrlfigipal vlvttlvtl avptgretlw mmwceatqdw clgvpvdsrg
 61 qpaedgefil lsvvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
 121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlgfstvlkt
 181 cmvrvpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep
 241 tgayytltas nqrwlneti qefnqlaeav avhdeeiaas ggvgsvfevd vyhaldghei
 301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravger v ieqietgppr plyatfavva
 361 gatvdtlage vg

FIGURA 58

SEQ ID No. 48

1 ctgcagacac ccgccccgcc ttctcccgga tcgtcatgtt cggcgactcc ctacagcaca
 61 ccggcaagat gtactccaag atgcgcggct acctgccgtc ctccccgccg tactacgagg
 121 gccgcttctc gaacggcccc gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga
 181 cgatcgccaa cgaggccgag gggggcgcgga ccgcagtcgc ctacaacaag atctcctgga
 241 acccgaagta ccaggtcatt aacaacctcg actacgaggt caccacagttc ttgcagaagg
 301 actcgttcaa gcccgacgac ctggatcatc tgtgggtggg cgccaacgac tacctggcct
 361 acggttgaa cacggagcag gacgccaagc gggtgcgcgga cgccatctcg gacgcggcaa
 421 accgcatggt cctgaacggc gcgaagcaga tctgtctgtt caacctgcc gacctgggcc
 481 agaaccgctc cgcccgtcc cagaaggctg tcgaggccgt ctgcacagtg tccgctacc
 541 acaacaagct gctctcaac ctgcccggc agctcgcccc gacgggcatg gtcaagctgt
 601 tcgagatcga caagcagttc gcggagatgc tgcgcgacct ccagaacttc ggctgagcg
 661 acgtggagaa cccgtgtctac gacggcggct acgtgtggaa gccgttcgcc acccggctcc
 721 tctgaccga ccggcagctg tcggcctct cgccccagga gcgcctggcg atcgtggca
 781 acccgtctct ggcacaggcg gtagcttcgc cgatggcccc ccgctcgcc tcgcccctca
 841 actcggaggg caagatgtt tgggaccagg tccacccacc caccgtggtc cacgcccgcc
 901 tctcggagcg cgccgccacc tcatcgaga cccagtaga gttctcgcc cactagtcta
 961 gaggatcc

FIGURA 59

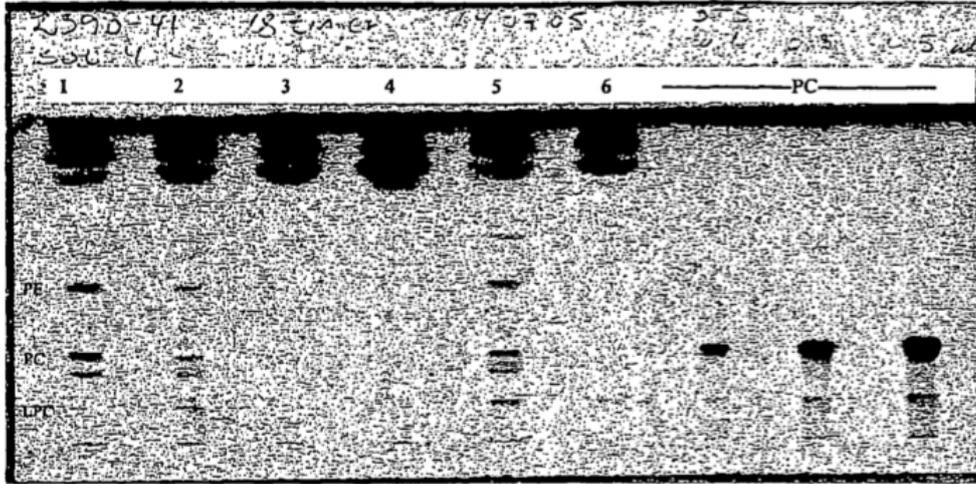


FIGURA 60

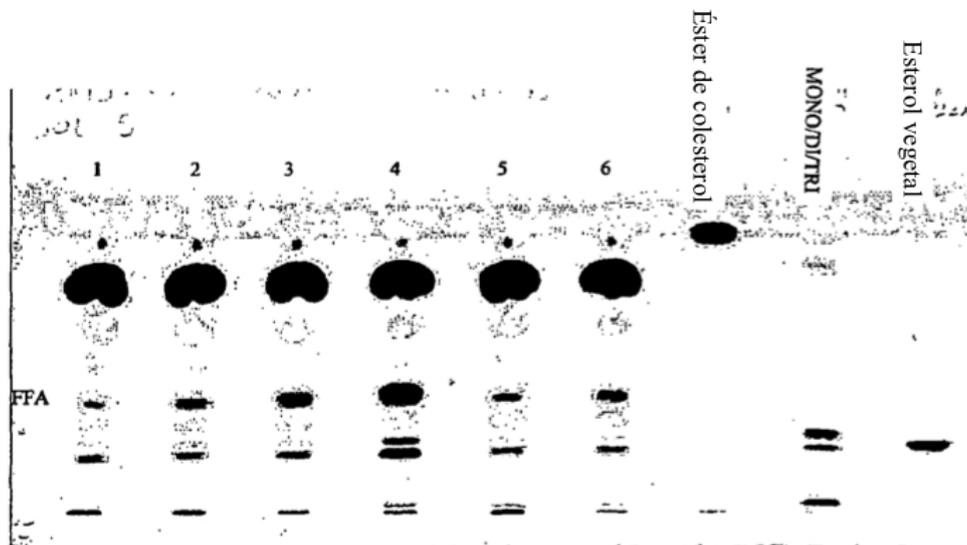


FIGURA 61

1. L131
2. S. avermitilis
3. T. fusca
4. Consensus

```

1          1                               50
1 (1) -----MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAG-----
2 (1) -----MRRSRITAYVTSLLLAVGCALTGAATAQASPA-----
3 (1) VGS GPRAATRRRLFLGIPALVLTALTLVLAVPTGRET LWRMWCEATQDW
4 (1)          MRRSRFLA  ALILLTLA  AL  GAA  ARAAP

          51                               100
1 (32) -----P-AYVALGDSYSSGNGAGSYID
2 (33) -----AAATGYVALGDSYSSGVGAGSYLS
3 (51) CLGVPVDSRQPAEDGEFLLLSPVQAATWGNYYALGDSYSSGDGARDYYP
4 (51)          A A  YVALGDSYSSG  GAGSY

          101                              150
1 (53) SSGD---CHRSNNAYPARWAAANAP---SSFTFAACSGAVTTDVIN---
2 (57) SSGD---CKRSSKAYPYLWQAAHSP---SSFSFMACSGARTGDVLA---
3 (101) GTAVKGGCWRSANAYPELVAEAYDFA--GHLSFLACSGQRGYAMLDAIDE
4 (101) SSGD  C RSTKAYPALWAAAHA  SSFSF  ACSGARTYDVLA

          151                              200
1 (93) --NQLGALNAST--GLVSITIGGNDAGFADAMTTCVTS-----SDSTCL
2 (97) --NQLGTLNSST--GLVSLTIGGNDAGFSDVMTTCVLQ-----SDSACL
3 (149) VGSQLDWNSPHT--SLVTIGIGGNDLGFSTVLKTCMVR-----VPLLDS
4 (151)  QL  LNS  T  LVSITIGGNDAGFAD  MTTCVL          SDSACL

          201                              250
1 (133) NRLATATNYINTLLA-----RLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMY
2 (137) SRINTAKAYVDSTLPG-----QLDSVYTAISTKAPSAHVAVLGYPRFY
3 (191) KACTDQEDAIRKRMKF----ETTFEELISEVRTRAPDARILVVGYPRI
4 (201)  RIA  AK  YI  TLPA          RLDSVYSAI  TRAP  ARVVVLGYPRIY

          251                              300
1 (176) LASNPWYCLGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAH-----GF
2 (180) KGGG-SCLAGLSETKRSAINDAADYLNSAIAKRAADH-----GF
3 (237) PEEPTGAYYTLTASNQRWLNETIQEFNQQLAEAVAVHDEEIAASGGVGSV
4 (251)  SG  LGLS  TKRAAINDAAD  LNSVIAKRAADH          GF

          301                              350
1 (215) RFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLP-----VWESYH
2 (218) TFGDVKSTFTGHEICSSSTWLHSLDLLN-----IGQSYH
3 (287) EFVDVYHALDGHEIGSDEPWVNGVQLRDLATG-----VTVDRSTFH
4 (301) TFGDV  TF  GHELCSA  PWLHSLTLP          V  SYH

          351                              395
1 (248) PTSTGHQSGYLPVLNANSST-----
2 (252) PTAAGQSGGYLPVMNSVA-----
3 (328) PNAAGHRAVGERVIEQIETGPGRPLYATFAVVAGATVDTLAGEVG
4 (351) PTA  GHAAGYLPVLNSI  T
    
```